

東海大學環境科學與工程研究所

碩士論文

綠鬣蜥腸道菌叢中一株嗜熱性厭氧產氫菌

Clostridium sp. GI512 之分離與特性研究

Isolation and characterization of an anaerobic
thermophilic H₂-producing *Clostridium* sp. GI512
from green iguana enteric flora

指導老師：黃啟裕 博士

研究生：何志鴻

中華民國 一百零一年六月

June 2012

東海大學碩士班研究生
論文指導教授推薦書

環境科學與工程學系何志鴻君所提之論文

題目：綠鬣蜥腸道菌叢中一株嗜熱性厭氧產氫菌 *Clostridium* sp. GI512 之分離與特性研究

Isolation and characterization of an anaerobic thermophilic H₂-producing *Clostridium* sp. GI512 from green iguana enteric flora

係由本人指導撰述，同意提付審查。

指導教授：黃啟裕 (簽章)

101 年 6 月 25 日

東海大學環境科學系碩士班

論文口試委員審定書

環境科學與工程學系碩士班何志鴻君所提之論文

題目：綠鬣蜥腸道菌叢中一株嗜熱性厭氧產氫菌 *Clostridium* sp. GI512 之分離與特性研究

Isolation and characterization of an anaerobic thermophilic H₂-producing *Clostridium* sp. GI512 from green iguana enteric flora

經本委員會審議，認為符合碩士資格標準。

論文口試委員召集人 鄧獻文 (簽章)

委員 賴美津
黃啓裕

中華民國 101 年 6 月 25 日

致謝

研究所終於畢業了，三年的時間，到最後才感覺到它的飛快，想當初懵懵懂懂的我，經過歷練後整個”升級”不少。現在的心情除了完成學業的愉悅與充滿迎接下一步挑戰的幹勁，眼角那滴不捨的淚就忽略它了吧。

最感謝的就是實驗室的大家長黃老師 啟裕，這段求學期間跟在老師身邊學習讓我獲益良多，不僅在專業知識方面有所成長，更學習到待人處事的道理。同時也感謝論文的口試委員賴老師 美津與郭老師 獻文，面對人生的重要口試，謹記兩位老師的批評，而且有你們的鼓勵，除了緩和口試時緊張的氣氛，更讓我對自己更有自信。

研究期間，感謝子寧學長與承翰學長在剛入學的時候，帶我們快速的認識環境與融入實驗室，受你們照顧不少。而實驗室情侶檔乃菁學姊與銘峻學長，在實驗上與生活上受你們照顧了，要順利走上紅毯喔!!接著是實驗的夥伴玥禎，遇到大學同一個實驗室的妳讓我鬆了口氣，有個很懂打理生活的照應，讓妳照顧了!而這段期間不管是歡笑或生氣也好，也恭喜妳畢業喔~昱智學弟與百淳學弟，謝謝你們，情義相挺的好麻吉，永遠無條件的替你們讚聲。無緣當學弟的仲恩哥，謝謝你那段時間的幫忙；孟欣學弟，謝謝你帶給大家的歡笑，而且時常跟你聊恐怖電影超刺激的!讓研究生生活放鬆不少（要好好對待承薇姊喔!）。畜產系的俊達學弟與天恩學弟，由衷的感謝你們提供的實驗儀器，應該說是實驗與生活上的協助啦!化材系的金門兄與阿娟姊，謝謝你們實驗上的相挺。成大的太酥學長，除了研究上，你獨特的笑聲給大家帶來歡樂；禹杰學長專業知識的不吝交流以及每次會議上的關心，謝謝你~上準公司的景智大哥與嘉大的文俊老師，受你們照顧許多，讓我學到急毒性水質檢測的專業知識。水質、土壤、奈米、空汙與大氣實驗室畢業的各位同學與在學學弟妹（族繁不及備載），謝謝

你們在我的碩士生活增添美麗的色彩。

最後也是最重要的，感謝一直在背後支持我的家人(還有在天國的爺)，有你們的鼓勵我才能完成學業。當然，寶貝姍瑜，讓妳照顧了，不但無私的包容我的脾氣，也一直在背後鼓勵支持我，口試那天妳的到場加油，令我感動不已，謝謝妳。

何志淦

民國一零一年捌月

摘要

本研究以綠鬣蜥糞便為接種來源增富培養其腸道中纖維水解菌群，以聚合酶鏈反應－變性梯度凝膠電泳（PCR－DGGE）技術分析此高效率纖維分解產氫的馴養菌群，主要為嗜熱性厭氧菌屬與梭狀芽孢菌屬。使用熱篩與滾管技術成功自此穩定菌群中分離出一株嗜熱性厭氧產氫菌株，暫名為 GI512 進行後續鑑定及特性研究。分析 16S rDNA 序列發現此菌株在親緣性與 *Clostridium thermopalmarium* 和 *Clostridium thermobutyricum* 相似。生理生化鑑定結果為革蘭氏陽性菌、菌體呈桿狀與末端產生孢子。分離菌株生長溫度範圍為 45~55°C，pH 範圍 6~9，最適生長溫度為 55°C，最適生長 pH 7.01。以葡萄糖為唯一碳源時有最大比生長速率（0.69 hr⁻¹）與氫氣產量（0.88 mol/mol），且生長時 yeast extract 為必需物質。菌株 GI512 培養至穩定期時，菌體內產生類似內涵體結構，經染色與氣相層析分析發現為長鏈的聚羥基烷脂聚合物。菌株對於各抗生素最小抑制濃度為 Ampicillin，0.5 µg/ml、Kanamycin，4.0 µg/ml、Penicillin，8.0 µg/ml、Polymyxin B，2.0 µg/ml 與 Vancomycin，4.0 µg/ml。*Clostridium* sp. GI512 具有代謝乳糖、木糖、葡萄糖、阿拉伯糖與纖維雙糖的能力，但無法利用尿素、甘油、木聚糖與纖維素。使用此菌株醱酵碳水化合物時，氫氣、二氧化碳以及揮發性有機酸－丁酸為主要產物，並產生少量醋酸與乳酸。

關鍵字：醱酵產氫、綠鬣蜥、嗜熱性厭氧菌、梭狀芽孢桿菌 *Clostridium*。

Abstract

A novel anaerobic, thermophilic hydrogen producing strain GI512, was isolated from cellulolytic enrichment cultures inoculated with green iguana feces. Bacterial community analysis with PCR-DGGE of this enrichment cultures, and main was *Clostridium* sp. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequence of the isolate showed that strain GI512 was closely related to *Clostridium thermopalmarium* and *Clostridium thermobutyricum*. Cells of this isolate were Gram-positive, endspore-forming, rod-shaped and formed cream whitish colonies surround with bubbles on agar. Growth of the isolate occurs in the range of 45-65°C and pH 6-9. The optimum growth temperature was 55°C, pH was 7.01 and glucose concentration at 5 g/l. When growth in optimal conditions the hydrogen yield of strain GI512 was 0.88 mol H₂/mol substrate. Yeast extract was necessary for growth. Micrographs of *Clostridium* sp. GI512 showed inclusion body-like structure in stationary-phase cells and was determined as long-chain polyhydroxyalkanoate analysed by gas chromatograph. Growth of GI512 was inhibited by ampicillin, kanamycin, penicillin, polymyxin B and vancomycin. This strain could ferments arabinose, glucose, lactose, xylose and cellobiose, but not cellulose, glycerol, urea and xylan. In the fermentation of carbohydrates, butyrate, H₂ and CO₂ were the main end products, with small amount of acetate and lactate.

Keywords: hydrogen fermentation, green iguana, thermophilic anaerobe, *Clostridium*.

目錄

第一章 前言	1
1.1 研究動機	1
1.2 研究目的	2
第二章 文獻回顧	3
2.1 再生能源	3
2.1.1 能源現況	3
2.1.2 生質能	4
2.2 氫能與產氫方式	5
2.3 <i>Clostridium</i> 梭狀芽孢桿菌屬	7
2.3.1 <i>Clostridium</i> 分類	7
2.3.2 <i>Clostridium</i> 產氫能力菌株	8
2.3.3 <i>Clostridium</i> 產氫機制與路徑	10
2.4 微生物鑑定與分類	13
2.4.1 分類方式	13
2.4.2 PCR-DGGE	15
第三章 材料與方法	18
3.1 實驗流程設計	18
3.2 菌種來源	18
3.3 菌種培養與純化	20
3.3.1 除氧步驟	20
3.3.2 厭氧培養基	21
3.3.3 菌株分離	22
3.4 分析方法	23
3.4.1 生理特性 (Physiological characterization)	23

3.4.2 生化特性 (Biochemical characterization)	25
3.4.3 分子生物技術與菌相分析	28
3.4.4 醱酵產物分析 (Fermentation product analyzed)	36
第四章 結果與討論	39
4.1 菌群分析	39
4.1.1 纖維水解產氫菌群馴養	39
4.1.2 Nested-PCR 擴增 16S rDNA 片段	39
4.1.3 變性梯度膠體電泳 DGGE 菌群結構分析	41
4.1.4 菌群親緣分析	43
4.2 菌株分離純化	46
4.2.1 熱休克篩選	46
4.2.2 厭氧滾管分離	47
4.2.3 產氫菌 GI512 親緣分析	49
4.3 生理特性鑑定	50
4.3.1 菌相觀察	50
4.3.2 革蘭氏染色	51
4.3.3 莢膜染色	51
4.3.4 PHA 染色	52
4.4 生化特性鑑定	54
4.4.1 Catalase 測試	54
4.4.2 最適生長溫度	54
4.4.3 最適生長 pH	56
4.4.4 最適基質濃度	57
4.4.5 碳源基質利用種類	58
4.4.6 氮源基質利用種類	59

4.4.7 Yeast、Peptone 利用測試.....	60
4.4.8 硫酸鹽還原測試.....	61
4.4.9 硝酸鹽還原測試.....	61
4.4.10 抗生素耐受測試.....	62
4.5 菌株特性整理.....	64
4.6 醱酵平衡.....	66
第五章 結論.....	68
5.1 <i>Clostridium</i> sp. GI512 與序列相似菌株特性比較.....	68
5.2 建議.....	69
附錄.....	80
附錄一 GC-TCD 氣相產物檢量線.....	80
附錄二 GC-FID 液態產物檢量線.....	80
附錄四 <i>Clostridium</i> sp. GI512 16S rDNA 序列.....	82

表目錄

Table 2-1 Fermentative hydrogen production for <i>Clostridium</i> class	9
Table 3-1 Nested-PCR primers used for application of V3-V5 region of 16S rDNA in this study	31
Table 3-2 Reagent and temperature program in PCR reaction	32
Table 3-3 Reagent of 6% polyacrylamide gel in DGGE method.....	35
Table 4-1 Antibiotic susceptibility minimal inhibitory concentration of strain GI512	62
Table 4-2 Morphological and biochemical comparison of the isolate <i>Clostridium</i> sp. GI512 to other closely related <i>Clostridium</i>	64
Table 4-3 Comparison of hydrogen production from glucose by the isolate GI512 and other <i>Clostridium</i> sp.....	66

圖目錄

Figure 2-1 Intricate food web of methanogenic anaerobic digestion	10
Figure 2-2 Hydrogen formation pathways in anaerobes.....	12
Figure 2-3 Principle of denaturing gradient gel electrophoresis.....	17
Figure 3-1 Flowchart of experimental design.....	19
Figure 3-2 Schematic diagram of Hungate gas station.....	20
Figure 3-3 Experimental setup for biological hydrogen production test	38
Figure 4-1 DNA concentrations and agarose gel electrophoresis profile of 16S rDNA fragments	40
Figure 4-2 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profile of 16S rDNA fragments	42
Figure 4-3 UPGMA dendrogram indicating similarity of DGGE pattern of 16S rDNA fragments from lizard enteric mixed culture.....	43
Figure 4-4 Microbial community structure analyses with cellulose degradation and hydrogen production.....	44
Figure 4-5 Dendrogram showing the interrelationships within different sequenced OTU of lizard enteric flora system and closely related species.....	45
Figure 4-6 Biogas production of lizard enteric mixed culture with heat shock for different time(water bath 100°C)	46
Figure 4-7 Isolation of H ₂ -producing anaerobes by roll tube technique.....	47
Figure 4-8 Cumulative gas production, hydrogen production and hydrogen percentage of isolated colonies from lizard feces growth	48
Figure 4-9 Dendrogram showing the interrelationships within hydrogen producing strain GI512 and closely related species	49
Figure 4-10 Phase-contrast micrographs of this isolate strain GI512.....	50
Figure 4-11 Transmission electron micrographs of hydrogen producing strain GI512 negative staining with 6% uranyl acetate.....	51

Figure 4-12 Micrographs of hydrogen producing strain GI512 with gram staining test.....	51
Figure 4-13 Micrographs of hydrogen producing strain GI512 with capsule staining test.....	52
Figure 4-14 Micrographs of lipid structure with sudan black strain after stationary phase	53
Figure 4-15 Chromatographic of lipid structure with hydrogen producing strain GI512.....	53
Figure 4-16 Temperature effect on growth of hydrogen producing strain GI512	55
Figure 4-17 Specific growth rate of hydrogen producing strain GI512 in different temperature between 25 and 65 °C	55
Figure 4-18 Initial pH effect on growth of hydrogen producing strain GI512 .	56
Figure 4-19 Specific growth rate of hydrogen producing strain GI512 in different pH between 6.34 and 8.82	56
Figure 4-20 Different glucose concentrations effect on growth of hydrogen producing strain GI512.....	57
Figure 4-21 Specific growth rate of hydrogen producing strain GI512 in different glucose concentrations between 5 g/l and 50 g/l.....	58
Figure 4-22 Different nitrogen source effect on growth of hydrogen producing strain GI512.....	59
Figure 4-23 Growth curve of hydrogen producing strain GI512 culture with yeast extract and/or peptone	60
Figure 4-24 Growth curve of hydrogen producing strain GI512 in different sulfate	61
Figure 4-25 Growth curve of hydrogen producing strain GI512 in different concentration KNO ₃	62
Figure 4-26 Growth curve of hydrogen producing strain GI512 in different antibiotics	63

Figure 4-27 End-products yield of the isolate *Clostridium* sp. GI512 during fermentation from glucose..... 67

Figure 4-28 Cumulative hydrogen and CO₂ production and content of the isolate *Clostridium* sp. GI512 during fermentation from glucose. 67

第一章 前言

1.1 研究動機

隨著全球人口爆增，不僅造成許多環境污染問題，對於燃料的需求也日與劇增。目前人類主要能源為石化燃料，此燃料為遠古時期，動植物屍體被掩埋並積存在地底，經過數萬年地質變化轉變而成，除不可再生外，燃燒時會產生二氧化碳等溫室氣體，致使地球的氣候產生巨大變異，溫室效應為最大的元兇。台灣為島國型國家，地狹人稠，缺乏大量天然資源，主要能源需仰賴外國進口，因為國際石油價格波動造成民生物價上漲的事件時有所聞，如此更需發展再生性能源，如太陽能、光電能、水力、風力、地熱能、生物能與廢棄物產能（王，2005）。

而再生能源中又以生質能源為最具潛力，可使用廢棄物生產並同時解決垃圾問題，相當適合做為替代能源。國際保護協會（Conservation International）的學者提出，下個世紀以前生質能源將會解決全球40%能源需求（Totten, 2006）。台灣以農立國，每年龐大農業廢棄物，過去使用燃燒方式造成嚴重空氣汙染，若加以利用轉化為生質能源，為一舉兩得的方式。使用生物質轉化為能源對於環境無傷害，而生物質轉換過程不需投入大量成本，非常適合作為替代能源發展項目。

使用暗醱酵產生能源，不僅可解決有機廢棄物問題，更可回收具經濟效益的副產物，如醋酸、丁酸等。丁酸可進一步轉化為丁醇，為目前最適合內燃機引擎設計的生質燃料（Lee *et al.*, 2008）。暗醱酵能量累積後產生的氫氣平均熱值高（131 MJ/Kg）適合做為能源載體，且當氫氣作為燃料燃燒或轉換成電力時唯一的產物為水，為非常環保

的能源。氫氣，近來被視為未來最具潛力能源型式之一。

產氫方式非常廣泛，可用石化燃料能作為產氫能源，透過煤碳直接高溫氣化產生合成氣($H_2 + CO$)，但不可再生特性與溫室效應問題，非理想的生產方式。能夠直接轉換自然能源進行水分子裂解，利用如太陽光能、風力、水力與地熱等天然能量來源轉換為熱能或電能，進一步裂解或電解水分子產生氫氣與氧氣，較為具環保優勢與可再生能源方式。近年發展出以生物質作為再生能源生產方式，對於產氫程序，不只能解決有機廢棄物問題，更能夠回收具經濟效益酸醇類副產品。生物質產氫的基礎為厭氧消化系統，將複雜結構的有機物分解成小分子再經由醱酵過程產氫，產氫的過程分為光醱酵與暗醱酵，其中暗醱酵方是不受限於光能波長與照度的影響，為成本低廉的生產方式。

進行暗醱酵產氫的微生物種類繁多，主要為 *Clostridium* 菌屬，此類菌株發展歷史久遠，早期矚目重點為優異的產酸醇能力，可作為戰略物資，因此為科學家廣泛研究。近期文獻發現，此菌屬部分菌株產生酸醇副產物過程伴隨產生氫氣，而逐漸朝向生質氫氣方向發展。

1.2 研究目的

本研究擬從 (1) 草食性綠鬣蜥 (*Iguana iguana*) 新鮮糞便中增富培養具有高效能纖維水解醱酵產氫之共生菌群，使用 PCR-DGGE 技術分析培養期間微生物菌相變化。(2) 參考 Hungate 氏厭氧技術，分離培養並純化出具纖維水解與醱酵產氫微生物。經過數次繼代培養純化菌株，以分子生物技術分析 16S rDNA 比對基因庫 (GeneBank) 繪製親緣樹狀圖；分析菌株生理生化特性與代謝產物，包含菌體觀察 (外型、鞭毛、莢膜、產孢能力與內涵體結構)、最適生長環境因子探討 (溫度、pH、不同碳源與氮源、不同基質濃度、硫酸鹽還原與硝酸鹽還原)，希望分離出新穎生質能源價值微生物。

第二章 文獻回顧

2.1 再生能源

2.1.1 能源現況

石油為戰略性物資，其價格深深影響國際市場情勢與人類民生物資需求。而從石油輸出國組織(Organization of the Petroleum Exporting Countries; OPEC)於1960年初訂定國際原油公認價格為3美元／桶截至今天以來，已經上漲為95美元／桶的驚人價格，而途中歷經幾次波動，1973年為抵制以色列而實行原油禁運，造成油價大漲；1978年伊朗發生政變，供需失衡；再加上1998年底兩伊戰爭，戰略物資價格躍升。以上數次石油危機，重創全球市場。現今隨著交通發達，人類對於石化燃料的依賴頗深，國際原油總需求也來到280萬桶／年。石化燃料為遠古時期，動植物屍體被掩埋並積存在地底，經過數萬年地質變化轉變而成，具不可再生的特性，預估未來將會是持續看漲的趨勢。近年來各國研究學者將逐年嚴重的溫室效應與燃燒石化燃料造成二氧化碳排放連想一起，引發京都議定書與哥本哈根議定書種種重視碳平衡的環境問題，能源與污染的問題一刻都不容小覷(徐，2007)。

為解決能源短缺問題，各國紛紛轉而發展具再生性之替代能源。而國際環境規劃署(United Nations Environment Programme; UNEP)定義再生能源係指能取之不盡的天然資源，過程中不會產生污染物，例如太陽能、風能、地熱能、水力能、潮汐能、生質能等，都是轉化自然界的能量成為能源，並在短時間內(相對於億年以上才能形成的石化燃料)就可以再生。台灣並非石油的生產國，近98%能源供應仰賴進口，代表油價波動操縱著國內民生物資，一旦崩盤勢必造成嚴重衝擊。因此國內非常適合發展再生能源，特別為佔地規模小的生質能源更具潛力，更呼應台灣以農立國的

龐大農業廢棄物解決問題。

2.1.2 生質能

國內近幾年將生質能列為國家重要發展項目，並在民國九十八年公布再生能源發展條例，其中定義生質能為係指農林植物、沼氣及國內有機廢棄物直接利用或經處理所產生之能源。原料來源可分為木質生物質 (Wood Biomass) 與非木質生物質 (Non-wood Biomass)，其中木質生物質為林業廢棄物或都市綠色廢棄物等木質素為主要組成之原料，非木質生物質則包含污水污泥、農業廢棄物與都市固體廢棄物等富含有機物質原料。用以生產生質能的有機體原料—生物質轉化程序包括直接燃燒產生熱能與電能、衍生為流體或固體燃料以及轉換成氣態 (甲烷、氫氣與一氧化碳) 或液態 (乙醇、丁醇與柴油) 能源 (Demirbas, 2009; Berinstein, 2001; Johansson, 1993; Sim, 2002)。生質能源轉換技術整理如下：

(1) 熱轉換技術

熱轉換主要可包括燃燒、熱解與氧化。直接燃燒生物質原料或經簡單物理處理 (磨碎、壓縮) 再送進焚燒爐。熱解方式是在無氧環境下，將有機物質裂解轉換成氣體及少量液體與固體碳渣。而氣化生物質類似熱解，差異在於額外添加氧化劑與高溫 1200°C，可產生甲醇、氫氣與合成氣。

(2) 衍生技術

此技術主要將生物質轉化後產物或非熱轉換之衍生物質做為能源載體。常見為固態衍生燃料技術 (RDF) 與垃圾掩埋沼氣 (LFG)。透過精選分類廢棄物並再利用，可提供較高燃燒熱值與較低成本電力能源回收。

(3) 化學轉換程序

目前先進的技術為利用酯化反應將油菜、大豆、椰子、向日葵以及動

物油脂或廢食用油再利用，經化學方法轉酯化成生質柴油，更將目標放到具潛力的高含油藻類。

(4) 生物轉換程序

根據先前研究指出，酵母菌或細菌醱酵轉化生物質產生燃料，優於已知的厭氧消化程序（形成溫室氣體甲烷），利用含糖類或其聚合物生物質產生酒精或氫氣等生質燃料，較不易造成溫室氣體之產生（Johansson, 1993）。

2.2 氫能與產氫方式

氫氣可以透過不同方式生產，多為可再生性來源，且當氫氣作為燃料燃燒或轉換成電力時唯一的產物為水，為非常環保的能源（Hawkes *et al.*, 2002）。氫氣平均熱值高（131 MJ/Kg）適合做為能源載體，近來被視為未來最具潛力能源型式之一。產氫方式可能來自天然資源（太陽能、風、水力）、石化燃料（煤、石油）或生物質，再以直接或間接轉換為氫能，但現今氫氣產業大約 96 % 仍使用非再生能源生產（Ferchichi *et al.*, 2005；Balat, 2008）。

產氫程序主要分為電化學法、熱化學法與生物法，而其中熱化學法與電化學法必須將能量來源轉換成電能或熱能型式後間接形成氫氣。過程中需額外提供能源且在傳遞能源過程中容易造成損失，故選擇環境友好且能直接轉換的生物法較具優勢。生物法主要包含光合產氫與醱酵產氫，進行光醱酵主要的能量來源為光能，而暗醱酵則為利用碳水化合物產氫（Kothari *et al.*, 2012），以轉化程序來看似乎使用太陽光能的光合作用產氫會是最理想化之方式，但是反應器與光源設計會是難以突破的瓶頸。選擇醱酵產氫方式有較快產氫速率與操作容易的優勢，以有機物質作為基質產氫於應用較具可行性。近年文獻研究提到，醱酵產氫能夠同時解決有機廢

棄物並且產生潔淨氫氣能源，是未來極具發展潛力的技術之一（Wang and Wan, 2009）。暗醱酵產氫微生物種類大至為 *Clostridium* 與 *Enterobacter* 屬菌株，而目前以產氫能力較佳的 *Clostridium* 較被重視並廣泛研究(Oh *et al.*, 2009; Geng *et al.*, 2010; Cai *et al.*, 2012)。

暗醱酵泛指厭氧微生物醱酵其它生物光合作用轉換形成的生物質 (Biomass)，主要為醣類、蛋白質或上述物質之聚合物，作為微生物能量來源，不需光能即可進行反應而得名。此類菌株降解有機基質時伴隨產生電子，為維持電中性，以氫質子作為電子接受者進而產生氫氣(Westermann *et al.*, 2007)。暗醱酵產氫過程受到許多環境因子影響，包含溫度、pH、碳源基質、氮源種類等。溫度條件是暗醱酵產氫影響的重要因子之一，一般來說溫度越高對於生化反應以及酵素活性都具有正向幫助，能有效提高氫氣產量，但溫度高於醱酵菌株所能承受時，可能造成酵素失活或破壞脂肪酸結構進而影響到細胞膜通透性 (Morimoto *et al.*, 2004; 徐, 2007)。pH 條件亦是操作的重要參數，過於極端的 pH 會造成菌株的生長停止，而在暗醱酵產氫方面控制不同程度的 pH 值會影響產氫酵素活性甚至整體代謝路徑，造成最終產物的不同 (Wang and Wan, 2009)。醱酵產氫可利用的碳源物質種類繁多，如糖類、脂質或蛋白質。早期文獻研究中廣泛研究的基質為蔗糖與澱粉，近期轉而利用低成本的有機廢棄物質。而菌株合成蛋白質的氮源物質分為有機氮與無機氮，而離子電荷不同對於微生物代謝亦有差異，其中成分複雜的有機氮源為提供化學物質無法取代的生長輔因子 (cofactor)。上述碳氮源物質濃度過高時會抑制菌株生長，影響產氫表現。

2.3 *Clostridium* 梭狀芽孢桿菌屬

2.3.1 *Clostridium* 分類

根據 Bergey's Manual 將 *Clostridium* 菌屬歸類於 Firmicutes 厚壁門。如同命名一般，此門菌株表面包覆有堅硬的細胞壁結構，主要成分為胞壁酸 (Muramic acid)。所屬的 Clostridia 綱包含龐大數量的目、科與屬且發源於地球大氧化事件 (Great Oxidation Event) 之前 (Johnson and Francis, 1975)，因此可以視為好性氧 Firmicutes 門菌株 (如 *Bacilli*) 演化的祖先。梭狀芽孢桿菌屬 (*Clostridium*) 外型大部分為紡錘狀梭形，生化特性具有代謝醱酵類或蛋白質產生有機酸能力，另有四大特徵：(1) 桿狀外型 (2) 逆境條件時會形成內孢子 (Endspore) (3) 無法進行硫酸還原作用 (4) 厭氧生長但對於氧氣濃度耐受範圍較廣 (Stackebrandt and Rainey, 1997)。*Clostridium* 菌屬最早於 1981 年並提出，其後陸續歸類新發現菌株至此菌屬或深入研究並重新審查，受限於分子生物與鑑定技術發展近代才發展至成熟，許多 *Clostridium* 菌屬分類底下菌株出現誤判情況，直到 1994 年 Collins 等學者對於此菌屬親緣分類進行精確分析 (Collins *et al.*, 1994)。以基因序列作為親緣分類依據，*Clostridium* 菌屬演化樹圖呈現非單系類群 (Monophyletic grouping) 而是會形成數個不連貫的群集 (Clusters) 的異源群聚 (Heterogeneous assemblage) (Wiegel *et al.*, 2006)，將已知 *Clostridium* 菌屬分為 20 個群集 (Clusters)，分別為 Cluster I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII、XIII、XIVa、XIVb、XV、XVI、XVII、XVIII 與 XIX。以嚴格的分類來說，Cluster I 為典型 *Clostridium* 菌屬群集 (相對相似度 94–99%)，半數以上的菌株歸類在此，包括代表菌株 (Type species) 同時也是最早被發現的梭狀芽孢菌 *Clostridium butyicum*，為一株中溫產丁酸菌株。

2.3.2 *Clostridium* 產氫能力菌株

Clostridium 菌屬微生物分布範圍相當廣，於下水道、土壤底泥、動物瘤胃或人類腸胃道都有發現此類微生物的研究報告，以上環境亦有發現代表菌株 *Clostridium butyricum* 的蹤跡 (Cato *et al.*, 1986)，其中少數為致病菌如引發食物中毒的 *Clostridium perfringens* 或破傷風桿菌 *Clostridium tetani*，大多為腐生性細菌 (Hippe *et al.*, 1991; 徐, 2007)。

因為厭氧菌株生長不需氧氣 (甚至具有毒性) 並根據產氫酵素對於氧氣敏感特性，且以熱力學角度來看，相對厭氧微生物較不需消耗大量 ATP 代謝基質產生氫氣，自然環境中由結構複雜的微生物族群進行厭氧消化有機物質，隨後由甲烷菌群 (Methanogen) 快速消耗氫氣產生最終產物甲烷，造成氫氣無法累積使整體反應偏向甲烷化。由於 *Clostridium* 會產生孢子特性，使用動力學調控、熱休克處理 (Heat-shock treatment) 與添加化學藥劑等方式抑制甲烷菌，至於梭狀芽孢菌於不利生長環境則會形成孢子，新陳代謝停止並進入休眠狀態，能夠抵禦高溫、輻射、乾燥、極端 pH 值甚至有毒物質存在 (Valdez-Vazquez *et al.*, 2009)。許多文獻研究以此方式於環境中分離與純化 *Clostridium* 厭氧產氫菌 (Sparling *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001; Cheong and Hansen, 2006)。

Clostridium 菌屬微生物具有優異產氫能力以外，更包含基質利用的靈活性與多樣性、合成有經濟價值的副產物以及對於代謝產物與基質濃度的良好耐受性等優勢，下列 Table 2-1 綜合歷年文獻研究報告厭氧產氫 *Clostridium* 菌株與產氫能力比較。

Table 2-1 Fermentative hydrogen production for *Clostridium* class

Inoculum	Substrate	Maximum hydrogen yield	References
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glucose	2.0 mol/mol glucose	Chin <i>et al.</i> , 2003
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Glucose	1.08 mol/mol glucose	Zhang <i>et al.</i> , 2006
<i>Clostridium acetobutyricum</i> M121	Glucose	2.29 mol/mol glucose	Lin <i>et al.</i> , 2007
<i>Clostridium beijerinckii</i> L9	Glucose	2.81 mol/mol glucose	Lin <i>et al.</i> , 2007
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Xylose	0.73 mol/mol xylose	Lo <i>et al.</i> , 2008
<i>Clostridium butyricum</i> CGS2	Starch	9.95 mmol/g COD	Chen <i>et al.</i> , 2007
<i>Clostridium butyricum</i> EB6	POME	3.2 L/L med	Chong <i>et al.</i> , 2009
<i>Clostridium butyricum</i> ATCC19398	Glucose	1.8 mol/mol glucose	Lin <i>et al.</i> , 2007
<i>Clostridium butyricum</i> TISTR 1032	Sugarcane bagasse	9.61 mmol/g total sugar	Pattra <i>et al.</i> , 2008
<i>Clostridium pasteurianum</i> CH4	Sucrose	2.07 mol/mol hexose	Lo <i>et al.</i> , 2008
<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	Chitinous wastes	2.2 mol/mol substrate	Evvyernie <i>et al.</i> , 2001
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Cellulosic biomass	2.3 mol/mol glucose	Levin <i>et al.</i> , 2006
<i>Clostridium thermolacticum</i>	Lactose	3.0 mol/mol lactose	Collet <i>et al.</i> , 2004
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> FYa102	Glucose	1.47 mol/mol glucose	Lin <i>et al.</i> , 2007
<i>Clostridium</i> sp. strain no. 2	Cellulose	0.3 mol/mol glucose	Taguchi <i>et al.</i> , 1996
<i>Clostridium</i> sp. Fanp2	Glucose	0.2 mol/L medium	Pan <i>et al.</i> , 2008

2.3.3 *Clostridium* 產氫機制與路徑

Clostridium 菌株產氫機制為厭氧環境下分解複雜結構有機物質轉換成為氫分子，為厭氧消化過程的一部分。厭氧消化過程如 Fig. 2-1 分為四個步驟、五大族群微生物共同作用。首先【a】醱酵菌進行水解（Hydrolysis, I）複雜結構的固態有機聚合物（如多醣類或蛋白質等）形成單體分子，隨後醱酵（Fermentation, II）成為低分子量的有機酸或醇之混合液，【b】以上醱酵產物由產氫醋酸菌作用進一步轉換成為氫氣與醋酸，酸化（Acetogenesis, III）以【c】醋酸微生物族群（Acetogens and homoacetogens）進行轉換氫氣與二氧化碳成為醋酸的可逆反應，並且與【d】嗜氫甲烷菌形成互營共生作用（Syntrophic associations）以及最後【e】嗜醋酸甲烷菌進行甲烷化（Methanogenesis, IV）形成二氧化碳與甲烷（Angenent *et al.*, 2004）。

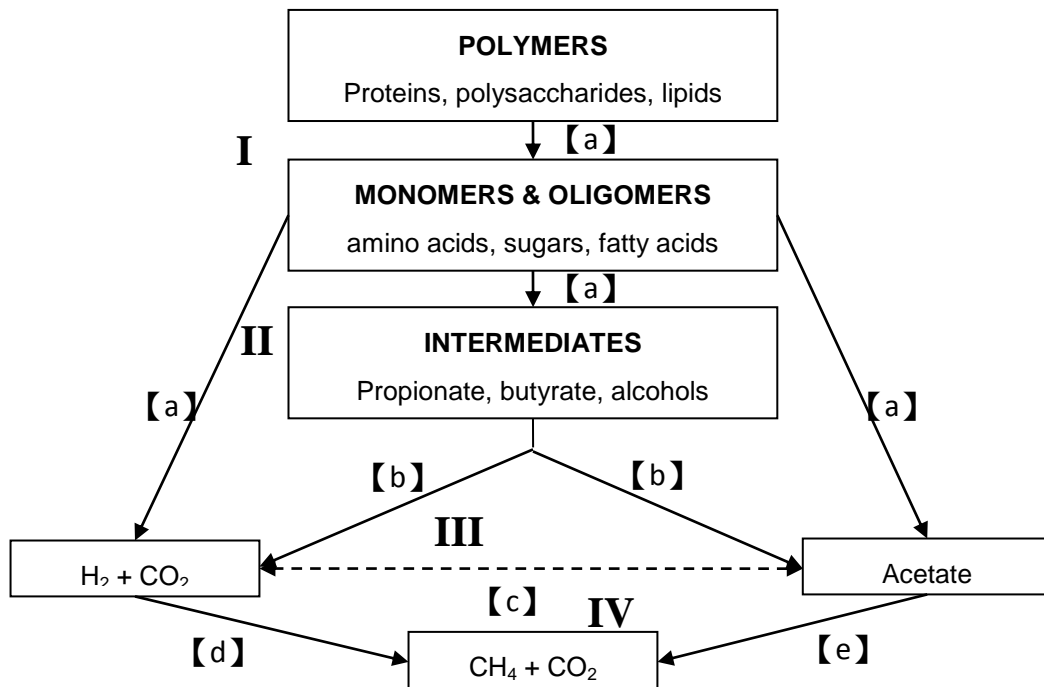


Figure 2-1 Intricate food web of methanogenic anaerobic digestion. Several trophic groups of microorganisms work together to convert complex organic material into methane and carbon dioxide.

以葡萄糖為碳源基質探討*Clostridium*菌株醱酵代謝途徑，如Fig. 2-2 所示。由途徑中可見葡萄糖分子進行糖解作用，生化上又稱為EMP途徑（Embden-Meyerhof-Parnas pathway），過程中轉換葡萄糖形成兩分子丙酮酸（Pyruvate）與NADH，經由氫化酵素（Hydrogenase）與鐵氧化還原作用（ferredoxin）釋放氫氣。代謝期間若傾向產生醋酸路徑則產氫量較高，若NADH累積則導致反應傾向產醇類或丁酸途徑，氫氣產量降低，因為Acetyl-CoA反應走向生產丁酸路徑的Butyryl-CoA時會消耗掉NADH，導致鐵氧化還原酵素只能產生兩分子氫氣，若反應走向Acetyl-phosphate則不消耗NADH，產生四分子氫氣，總反應如式2-2。



根據以上問題，多數研究指出控制基質濃度能有效影響產氫路徑，當基質濃度越大相對產氫速率提高但氫氣產量會降低，原因為Ferredoxin會累積高能型態NADH⁺，反應轉而產生乙醇而非氫氣或有機酸(Oh *et al.*, 2002)，亦有*Clostridium*菌株不同暗醱酵產氫實驗條件中，偵測到乙醇產生則該實驗組氫氣產量大幅降低的情況(Cai *et al.*, 2011)。即使途徑轉向較高還原態有機酸，但部分代謝產物仍具有經濟價值，如丁酸為具替代性燃料潛力的丁醇之前驅物質(Lee *et al.*, 2008)。

*Clostridium*產氫菌株生長多為中溫與高溫，而文獻研究指出高溫無論對於有機物降解或醱酵產氫皆為有利，且如甲烷菌等大部分耗氫微生物生長於中溫，如此溫度差異能減少污染機會並提高氫氣產量(徐, 2007)。

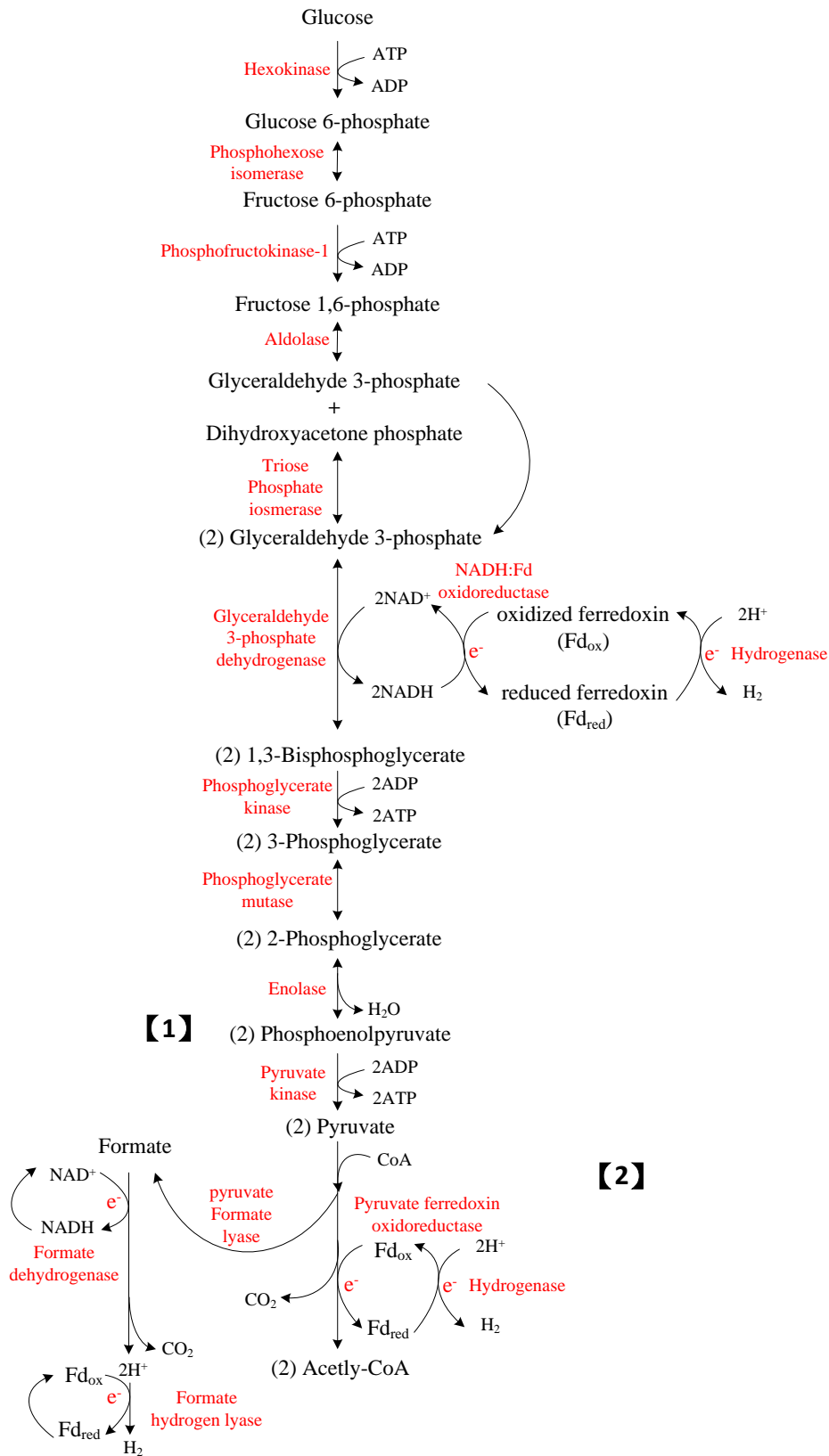


Figure 2-2 Hydrogen formation pathways in anaerobes.【1】Formate pathway in *E. coli*; and 【2】 Ferredoxin pathway in *Clostridium* sp. (Cai *et al.*, 2011) .

2.4 微生物鑑定與分類

2.4.1 分類方式 (廖, 2004)

微生物分類依據方法很多，早期藉由微生物型態（菌落型態與顯微鏡觀察）、運動性（周毛、纖毛與鞭毛）、培養特性（溫度、pH 與氧氣）、生理生化特性、化學組成、生態特性以及遺傳特性等等。其中微生物分類方式包括原核細胞與真核細胞為分別，之間的差異在於真核細胞有粒線體或葉綠體等胞器、能夠進行有絲分裂以及有明顯的核膜構造包覆遺傳物質，常見的真核微生物為真菌與酵母菌，而相對原核生物並無胞器結構、進行減數分裂以及遺傳物質聚集在細胞中間形成類核區，而原核微生物根據結構與特性不同，又分為古細菌（Archaea）與細菌（Bacteria），而分子生物方式分析發現，古菌轉錄轉譯方式與細菌差異甚大，聚合酶種類繁多，反而較為接近真核生物特性。外部無細菌細胞壁的肽聚糖構造，亦別於真菌的幾丁質或是植物細胞的纖維素，細胞膜的部分也主要雖為磷酯類結構，但並非如同其他生物為酯類鍵結而是醚類鍵結的方式，且磷酯結構側鏈並非脂肪酸，主要為異戊二烯（Isoprenoid）連接成為 20 個長鏈碳原子的側鏈，側鏈彼此互相銜接成為環狀結構使得細胞膜結構穩定，足以承受遠古時候極端環境（高鹽或高溫）。

雖然從古至今純化分離出來的菌株種類繁多而衍生出許多分類方式，但自然界 99% 微生物仍無法由人工方法於實驗室培養出來（Wayne *et al.*, 1987; Ward *et al.*, 1992; Amann *et al.*, 1995），文獻研究統計將分離微生物與原始環境總細胞數相比，相對百分比差異甚大（Amann *et al.*, 1995），故無法進行生理生化特性的鑑定。應用近代發展的分離微生物技術於微生物分類鑑定領域，發現即使看似差異甚大的微生物在 DNA、RNA 與蛋白質所獲得的訊息上，親緣特性分析可能來自相同祖先，微生物分類名著 Bergey's

Manual 中亦提到分子生物分析後許多微生物歸類大幅調動，解答過去分類誤判與無法解釋之現象。使用分子序列分析能夠不經過分離培養方式直接對環境樣本分析，能有效解決傳統方法的缺點也反映出生物演化的訊息，因此成為目前演化分類的重要依據(Woese, 1987)。

微生物分類分子生物分析主要是核糖體中 DNA，原核生物體內攜帶遺傳訊息的物質存在於核糖體、質體等，而目前分類重要依據為參考核糖體中的核糖核酸 (Ribosomal ribonucleic acid; rRNA)，具有普遍統一性 (Universal distribution)、高度保守性 (High conservation) 且演化速率慢或稱序列保留性高之優勢，無論真核或原核生物的生物體內皆具有 rRNA，所有微生物必要之主要胞器且功能在所有核糖體中相同，同時其含量與生物體之成長速率成正比，而且結構或序列上均有極大之相似度，即包含可變和穩定序列，所以親緣關係近和非常遠的微生物都能比較。核糖體分為大次單元 (Large subunit) 與小次單元 (Small subunit)，為細胞轉譯遺傳訊息合成蛋白質的重要場所，為生物細胞中含量最豐富的胞器，原核生物核糖體約佔細胞乾重的 20%，其中大次單元中包含 34 種蛋白質與兩種核酸成分 5S rRNA (about 120 bp) 與 23S rRNA (about 3.0 kbp)，小次單原則為 21 種蛋白質與 16S rRNA (about 1.5 kbp) 所組成 (Olsen *et al.*, 1986)。文獻研究探討三種不同核酸作為分類依據的合適性，5S rRNA 長度太短，物種間相似度高突顯遺傳訊息不足，而 23S rRNA 長度序列過長，定序花費時間太久且準確性要求較高，少用於分類 (Gutell *et al.*, 1993)。16S rRNA 序列長度適中，目前普遍應用於原核生物於分子生物分類學之依據 (Ludwig and Schleifer, 1994)。而 16S rRNA 結構中分為較普遍性與保守性 Universal 區段與變異性 Variable 區段，為分子生物技術中引子設計的參考關鍵。

2.4.2 PCR-DGGE

遺傳指紋譜技術 (Genetic fingerprinting techniques) 應用於探討微生物群集結構與變化的情形。利用電泳方式使原本攜帶負電荷 DNA 於電場中向正電極泳動，同時利用膠體物質形成網狀結構使不同片段大小與變性程度之 DNA 泳動率產生差異，藉以區分不同微生物來源之 DNA (Hill *et al.*, 2000)。變性梯度膠體電泳 (Denaturing gradient gel electrophoresis; DGGE) 技術於早在 1979 年就由 Fischer 與 Lerman 學者提出並發展，之後才應用於生態學探討菌群變化 (Muyzer *et al.*, 1993)。而 DGGE 特殊圖譜能夠呈現出整體菌群近乎 1% 變化差異，膠片上單一亮帶 (Band) 並非完全代表單一菌株，因為技術限制導致比對序列長度不足，無法精準分類至菌種層級作為分類單位，此時需引入生物統計中 OTUs (operational taxonomic units) 概念，以 OTU 為最小分類單位進行亮帶分析，根據出現位置以及數量多寡做權重計算 (weight algorithm，根據亮帶出現與否標記為 0 或 1，若分析結果的亮帶樣本數多則更具鑑別性)，始能進行各採樣點生態歧異程度比較。若控制 DNA sample 注入量更可由亮帶濃淡判斷該菌株豐富程度，因此適合研究自然環境中微生物族群的消長情形 (Bertoldi *et al.*, 1983; Fermor *et al.*, 1985)。

變性梯度膠體電泳原理如以下：首先萃取出混合菌群的染色體 DNA 進行 PCR 片段擴增，此時挑選一端引子添加連續 30—50 個 G 或 C 鹼基的 GC-clamp 設計，作用在於防止變性劑過度反應使雙股 DNA 在鹼性梯度下完全解開為單股 DNA，使電泳解析能力下降。(Lowe *et al.*, 2002; Muyzer and Smalla, 1998)。而 DGGE 電泳前的 PCR 產物製備，主要針對細菌 16S rDNA 的變異區 (Variable) V3-V5 區域間進行 PCR，各菌株於此區域的變異程度高，較容易區分不同種類菌株相同區段的差異，過去文獻指出使用此 V3-V5 區間進行片段擴增相較於其他變異區，更適合作為探討環境中微

生物族群分布之研究 (Yu and Morrison, 2004)。由於 DGGE 技術受限於核酸片段長度的限制(最適為 500-700 bp)，對於數千鹼基對的染色體 DNA，其中包含其它具核酸序列訊息物質，如核糖體大次單元中的 23S rDNA、mRNA 等，若直接設計目標片段引子容易產生錯誤的黏合，擴增出非目標的片段序列，造成洋菜膠電泳與變性梯度電泳的誤判，故使用巢式 PCR (Nested-PCR) 技術，先設計一較大核酸片段引子 (其中涵蓋目標片段) 進行第一次 PCR，再將此片段擴增產物以目標片段引子進行第二次 PCR，此方法使用兩組引子更精準的針對目標片段的進行擴增，專一性也更為良好。

將微生物菌群中各菌株 DNA 片段擴增出相同長度序列片段，其後將此 PCR 產物注入變性梯度膠片，電泳過程中序列組成不同變性程度亦相異，造成泳動速率不同而達到分離不同序列目的地。製作 DGGE 膠片時加入尿素與甲醯胺等物質能使 DNA 鹼基對間氫鍵斷裂 (變性作用)，DNA 雙股結構互補鹼基 A 與 T 之間有兩對氫鍵而 G 與 C 之間有三對氫鍵而產生結合合力不同，故 AT 與 CG 於序列中位置、數量差異使變性時雙股 DNA 序列開鏈程度不相同，造成泳動時穿過聚丙烯醯胺 (Polyacrylamide) 膠體形成之網狀結構難易程度不同，進而分離出各菌株某相同長度片段序列差異造成電泳時於膠片上位置差異。應用 DGGE 鑑定環境樣本菌群變化實驗操作過程與原理示意圖如 Fig. 2-3。

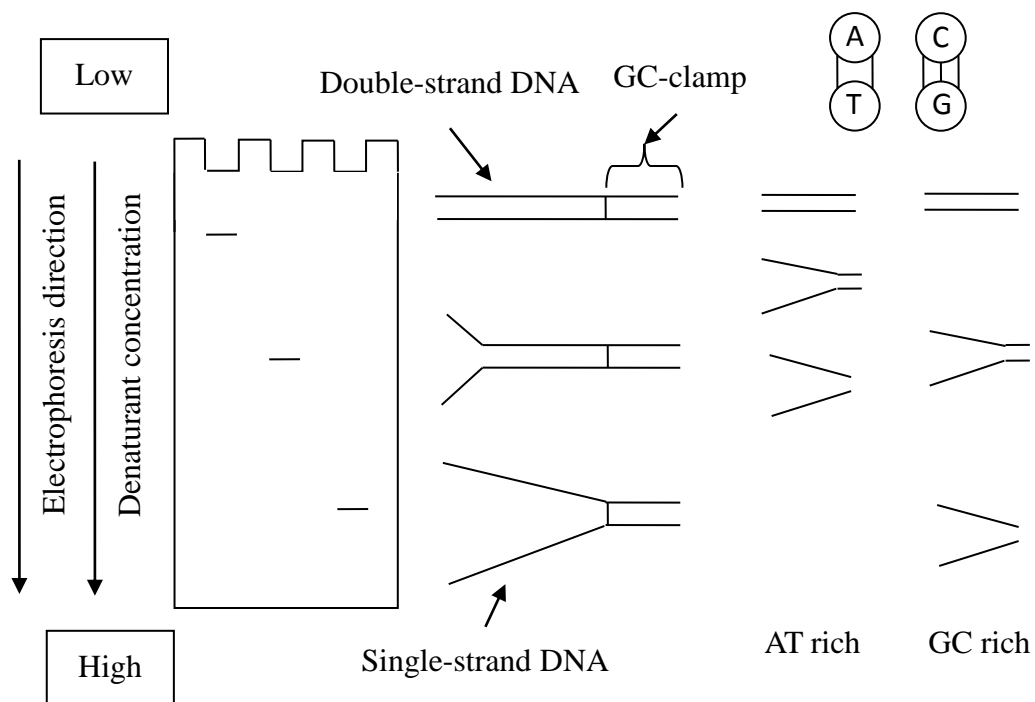
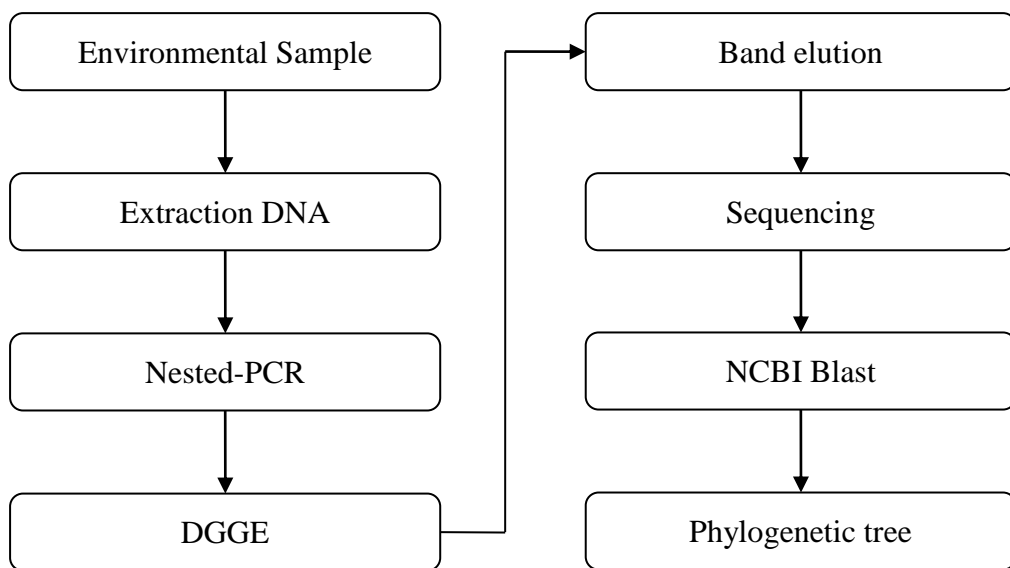


Figure 2-3 Principle of denaturing gradient gel electrophoresis.

第三章 材料與方法

3.1 實驗流程設計

本研究針對草食性綠鬣蜥 (*Iguana iguana*) 之糞便中微生物，探討其中纖維水解與醱酵產氫微生物菌相組成，進一步利用厭氧滾管技術 (Hungate roll tube technique) 成功從糞便混菌中成功分離出一株嗜熱性產氫菌，探討其生理生化特性、最佳生長參數以及使用分子生物技術鑑定菌種親緣關係。本研究之實驗流程圖如 Fig. 3-1。

3.2 菌種來源

本研究所使用原產地南美洲之陸生蜥蜴—草食性綠鬣蜥之糞便做為植種來源，文獻指出年幼期綠鬣蜥具有吞食成年蜥蜴糞便特性，以維持代謝難分解素食來源食物之穩定菌群 (Burghardt, 2004)。在研究室中以纖維素為唯一碳源進行繼代培養，得到一高效率纖維水解醱酵產氫混合菌群。培養方式為使用 200 ml 厭氧血清瓶，加入 90 ml 嗜熱性厭氧培養基與 10g 蜥蜴糞便，使用纖維素 α -cellulose (Sigma, USA) 5 g/l 作為碳源，於高溫(55°C) 厭氧條件批次培養。繼代培養以菌液與培養基體積 1:9 比例接種，分析混合菌相結構與纖維水解與產氫相關性。

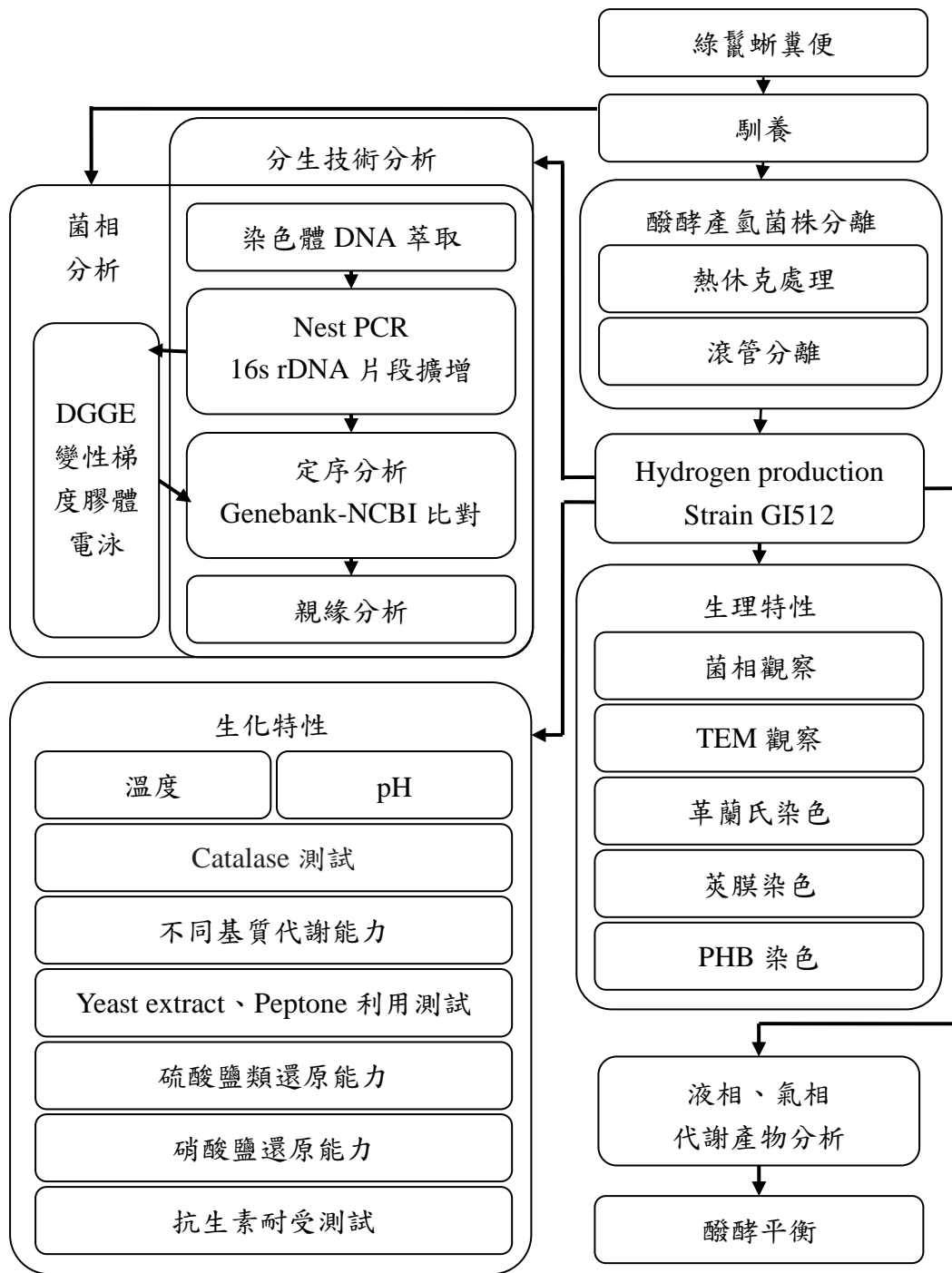


Figure 3-1 Flowchart of experimental design.

3.3 菌種培養與純化

3.3.1 除氧步驟

本研究使用 Hungate 氏除氧步驟 (Hungate, 1969; Bryant, 1972) 建立加氣站系統去除氧氣以維持微生物培養與實驗操作時絕對厭氧情形，加氣站裝置配置如 Fig. 3-2。加熱包包覆一中空玻璃管柱，管柱內裝有銅絲。加熱包預先加熱至 250-270°C，使用高氣密度銅管或塑膠軟管連接，操作實驗前先通入氫氣還原銅絲，待銅絲還原成粉色金屬光澤，始操作實驗。實驗中氣體鋼瓶中殘存氧氣通過管柱與高溫 (約 250°C) 銅絲接觸反應後形成氧化銅，達到氣體純化除氧步驟，反應式如下 (3-1)。

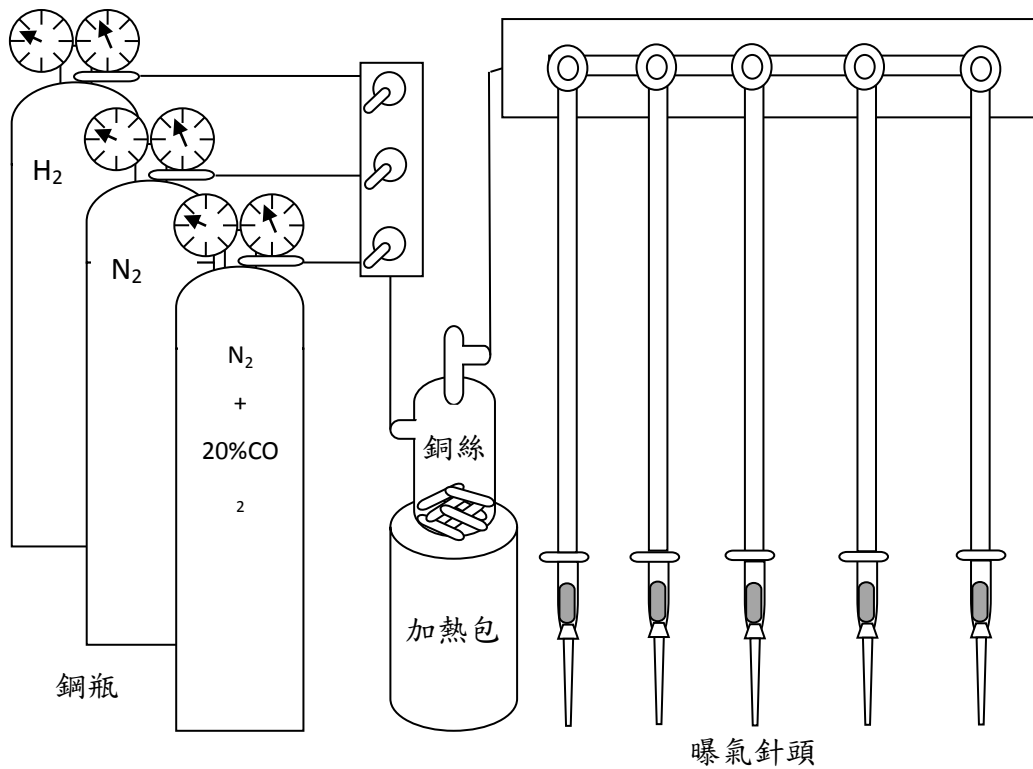
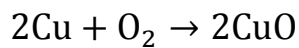


Figure 3-2 Schematic diagram of Hungate gas station.

3.3.2 厭氧培養基

本研究使用之培養基為嗜熱性厭氧菌培養基 (Thermophilic anaerobic medium; TA medium) (Huang *et al.*, 1988)，培養基製備方式為：基本培養基 a 成分，每公升試劑水含有 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g、 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.1 g、 $(\text{NH}_4)\text{Cl}$, 1.0 g、 K_2HPO_4 , 0.4 g、resazurin, 0.0005 g 以及 trace element solution, 1.0 ml。其中 trace element solution 儲備溶液成分為每公升去離子水中先加入 37 %HCl, 1.0 ml、 Na_2EDTA , 0.5 g 使溶液呈酸性再加入其他螯合金屬鹽類： CoCl_2 , 0.05 g、 CuCl_2 , 0.03 g、 FeCl_2 , 2.0 g、 MnCl_2 , 0.05 g、 NiCl_2 , 0.05 g、 ZnCl_2 , 0.05 g、 AlCl_3 , 0.05 g、 H_3BO_3 , 0.05 g、 Na_2SeO_3 , 0.1 g 與 $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.05 g。加入上述藥劑定量後於圓底燒瓶內並曝氮氣煮沸，轉換為曝 CO_2 (20%) / N_2 氣體待冷卻至 60°C 加入 b 成分為每升試劑水包含 L-cysteine, 0.5 g 用以還原培養基以及 NaHCO_3 , 3.9 g 增加鹼度。此時添加的 Resazurin 指示劑呈粉紅色，若完全置換氧氣後會變成透明無色，始加入 Hungate 試管或厭氧血清瓶並以高氣密性橡膠塞配合螺旋蓋或鋁蓋進行密封達到厭氧之目的，進行高溫高壓滅菌 (121°C、1.2kg/cm³, 30 分鐘)。有別於一般滅菌程序，將時間提高到 30 分鐘能有效殺死具產孢子能力微生物 (Wiegel *et al.*, 2006)。滅菌後加入已厭氧滅菌處理的 c 成分每升試劑水 $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, 0.25 g 為還原劑以及適當碳源與營養成分 (yeast extract, 1.0 g、peptone, 1.0 g 與 vitamin solution, 10 ml)，而 vitamin solution 儲備溶液成分為每升去離子水包含 Biotin, 2.0 mg、Riboflavin, 5.0 mg、Vitamin B12, 0.1 mg、DL-Ca-pantothenate, 5.0 mg、Pyridoxine-HCl, 10.0 mg、Thiamine-HCl, 5.0 mg、Folic acid, 2.0 mg、Lipoic acid, 5.0 mg、Nicotinic acid, 5.0 mg 與 P-aminobenzoic acid, 5.0 mg，因維他命溶液不耐高溫滅菌，需用 0.22 μm 孔徑濾膜過濾除菌。植種體積為最終體積之 10%。

3.3.3 菌株分離

本研究使用熱休克處理 (Heat-shock treatment) 與厭氧滾管 (roll-tube) 技術 (Hungate, 1966) 分離醱酵產氫純菌。實驗過程將裝有培養菌液之厭氧血清瓶隔水加熱，待中心溫度上升至 100°C 後維持0、10、30與60分鐘，進行鏡檢與個別接種至TA培養基。鏡檢使用位相差顯微鏡 (Phase contrast microscope) 觀察菌體破壞與孢子產生情形，並在繼代培養期間分析甲烷產量，以能完全抑制甲烷菌且不造成產孢菌株死亡為最佳處理時間。

將上述熱休克處理後培養之菌液做為接種來源，使用Hungate厭氧滾管技術分離單一菌落。實驗過程以TA培養液添加25 g/l瓊脂 (Agar) 製備成固態培養基，操作前將無菌培養基隔水加熱並維持 60°C 熔融狀態，以2 g/l葡萄糖作為碳源，已熔融瓊脂之試管植入菌液並吸取體積10%至下一支試管達連續稀釋效果，分別混合均勻後將試管水平平置於冰水浴 (增加瓊脂於高溫培養下強度) 快速撥動旋轉約30秒，此時已接種之固態培養基凝固成一白色層包覆於試管內壁，靜置培養於 55°C 培養箱。待菌落形成後，以橡膠軟管連接無菌Pasteur pipet (Kimble & Chase, New Jersey) 玻璃毛細滴管尖端將菌落連同瓊脂吸取挑起植種於液態培養基，置於 55°C 下培養。上述實驗過程器材與培養基全程以厭氧加器站曝含 CO_2 之氮氣混合氣維持厭氧狀態 (以Resazurin指示劑為無色作為判斷依據)。此滾管挑菌步驟需進行重覆三次以上確保菌株純度，實驗最終以顯微鏡觀察菌相並分析氣體產物組成，挑選一株產氫能力較佳之菌株暫名為GI512，進行為後續生理、生化特性研究。

3.4 分析方法

3.4.1 生理特性 (Physiological characterization)

3.4.1.1 菌株觀察 (Morphology)

根據實驗需求不同，分別使用光學顯微鏡 (Model CX21, Olympus, Japan) 與位相差顯微鏡 (Model BX53, Olympus, Japan)。光學顯微鏡使用於胞器或革蘭氏染色前處理之檢體觀察，方便辨別區域性顏色變化。位相差顯微鏡使用聚光鏡將發散的光線集中成平行光線通過檢體，而根據檢體各部分折射率的不同與背景形成對比程度差異的明暗區域，調整焦距使欲觀察區域聚焦於位相板上，特別適合觀察活體，無論是在外型、內孢子與移動性都可直接觀察而不需破壞性或侵入性的前處理步驟 (如熱固定、染色等)。為便於觀察，可使用 15 g/l Agar 固定檢體以利拍照。

3.4.1.2 穿透式電子顯微鏡 (Transmission electron microscopy; TEM)

使用前須進行樣品前處理，吸取培養至對數生長期之菌液滴至鍍碳銅網 (Formvar film/Carbon-coated copper net) 上，靜置 6 分鐘使菌體沉澱，以濾紙吸取多餘菌液。隨後滴上 6 % 醋酸鈾 (Uranyl acetate) 負染色 10 秒。醋酸鈾負染具有強烈對比容易觀察外，對於膜狀結構的保存性較佳，可有效防止磷酸脂質流失，保留菌體原始外貌。樣本製備完成後使用穿透式電子顯微鏡 (JEM-1200CX II, JOEL, Japan) 觀察。

3.4.1.3 革蘭氏染色 (Gram staining)

革蘭氏染色是微生物鑑別染色法 (Differential staining) 的重要方法之一，根據細胞壁結構不同可分為兩大類菌，即革蘭氏陽性菌 (Gram-positive; 結果呈藍紫色) 與陰性菌 (Gram-negative; 結果呈紅色)。使用市售染色套件 (Gram stain kits & Reagents; Difco; USA) 進行細胞染色，將培養至對數生長期之菌液塗抹於載玻片上自然風乾與熱固定。首先以結晶紫 (Crystal violet) 染色並用試劑水清洗，再滴上碘液與結晶紫形成細胞內複合物，之後以脫色劑 (Acetone: Isopropanol = 1: 3) 清洗，此時醇類造成細胞壁脫水且溶出脂質，陽性菌細胞壁厚且脂質結構少，使複合物無法滲透出來；陰性菌則相反。最後使用沙番紅 (Safranin) 染色時則容易附著至陰性菌，形成顏色差異。

3.4.1.4 莢膜染色 (Capsule staining)

莢膜為細菌分泌的高含水量膠狀物質，主要附著在細胞壁並圍繞細胞，功能為保護細胞防止被吞噬，成分多為聚醣類或醣蛋白，致病菌若具有莢膜結構時其毒性與致病力較強。染色時先以結晶紫將菌體與莢膜一併染色，此時染劑微弱附著莢膜上，再以 20 % 硫酸銅 (Copper(II) sulfate pentahydrate) 溶液脫色並複染莢膜，最後以明視野顯微鏡觀察。

3.4.1.5 聚-β-羥丁酸顆粒染色 (poly-β-hydroxybutyrate; PHB staining)

聚-β-羥丁酸 (PHB) 為聚羥基脂肪酸酯類 (polyhydroxyalkanoates; PHA) 是微生物在代謝過量碳源基質時能量儲存物質，累積於微生物內含體 (Inclusion body) 特殊結構中。菌液塗抹於玻片風乾，以 0.3 % (w/v 溶於 70 % 乙醇) 脂溶性染劑蘇丹黑染色 15 分鐘，以 96 % 二甲苯 (Xylene) 脫色後以試劑水清洗，以沙番紅 (Safranin) 20 g/l 針對胞質染色，光學顯微鏡觀察黑色 PHB 顆粒結構。

3.4.2 生化特性 (Biochemical characterization)

3.4.2.1 微生物生長 (Microbial growth)

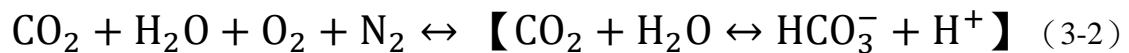
本研究由綠鬣蜥糞便篩選之醱酵產氫純菌 GI512 以可溶性碳源葡萄糖為生長測試基質，使用分光光度計 (Spectrophotometer SPECTRONIC® 20D⁺, Spectronic Instruments, USA) 在波長 600 nm 分析吸收之光密度 (Optical density)，測量菌液濁度作為菌株之生長情形。

3.4.2.2 最適生長溫度 (Optimal temperature)

以濃度 5g/l 葡萄糖作為 TA 培養基單一碳源並添加 1g/l Yeast extract 測試 GI512 菌株最適生長溫度，以 35、45、55 與 65°C 範圍條件監測菌株生長情形。

3.4.2.3 最適生長 pH (Optimal pH)

不同 pH 值條件控制使用類似於血液中的緩衝溶液系統 (Bicarbonate buffer system)，主要是碳酸氫根離子 HCO_3^- 與氣態 CO_2 的調控，化學平衡式為 (3-2)，培養基配置的方程式為 Henderson-Hasselbalch (Esser, 2010) (3-3)。設計測試範圍為 pH 6.34–8.82。以濃度 5 g/l 葡萄糖添加 1 g/l Yeast extract 於最適生長溫度下測試 GI512 生長情形。



(Gas phase in headspace)

(Liquid phase in medium)

$$\text{pH} = 6.1 + \log \left(52 \frac{\text{g/l NaHCO}_3}{20 \% \text{CO}_2} - 1 \right) \quad (3-3)$$

3.4.2.4 過氧化氫酶測試 (Catalase assay)

因為厭氧微生物體內不具有產生過氧化氫酶能力，生長於含氧環境無法將累積的過氧化氫分解成水和氧氣，最終導致菌體死亡。本實驗使用大腸桿菌 (*Escherichia coli*) 與金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 作為參考菌株，培養至對數生長期後滴取 3 %H₂O₂ 測試細胞代謝情形，若有過氧化氫酶會形成氣泡 (徐, 2004)。

3.4.2.5 不同基質代謝能力

本實驗使用兩種市售厭氧菌鑑定套件 (API 20A、Biolog AN microplate) 進行不同基質代謝測試，因為單一培養盤上設計多種基質，可快速分析厭氧菌株基質代謝能力 (Appelbaum *et al.*, 1983)。將菌株培養至對數生長期以不含碳源之 TA 培養基清洗三次，接種後於 36±2°C 培養 24 小時，根據說明書指示記錄呈色結果。Biolog AN microplate 有 96 種不同基質，主要為醣類與胺基酸，若菌株代謝該基質產生酸化反應會呈現紫色結果。API 20A 測試基質包括 L-tryptophane、Urea、D-glucose、D-mannitol、D-lactose、D-saccharose、D-maltose、Salicin、D-xylose、L-arabinose、Gelatin、Esculin、Glycerol、D-cellobiose、D-mannose、D-melezitose、D-raffinose、D-rhamnose 與 D-trehalose。根據說明書添加菌液與藥劑 (INDole 測試注入礦物油、GELatin 填滿菌液)，培養後添加指示劑 (INDole 添加 XYL 試劑混合均勻靜置 2-3 分鐘後再添加 HER 試劑靜置 5 分鐘、UREase、GELatin 與 ESCulin 除外、其餘測試組加入 BCP 試劑後觀察) 待顏色變化穩定後記錄結果。

AN Microplate 相關文獻提出若菌株本身具產生色素能力會造成判斷誤差 (Bochner, 1989)，其中針對結果與 API 20A 結果衝突部份 (Cellobiose、Glycerol、Lactose、Xylose) 以及上述套件未包含之基質成分 (Cellulose 與 Xylan) 進行批次培養實驗，條件為測試基質 5 g/l 濃度加 1 g/l yeast extract

於最適培養溫度與 pH 下，監測生長情形並再次確認基質代謝結果。

3.4.2.6 Yeast extract 與 Peptone 添加測試

由先前實驗發現厭氧產氫菌GI512於未含yeast extract與peptone之TA培養基生長情形不佳。對於微生物生長，yeast extract提供輔因子 (co-factor) 而peptone提供所需蛋白質，但因為兩種物質成分複雜，仍未有明確營養來源分界。本實驗探討5g/l葡萄糖為TA培養基單一碳源條件於最適培養溫度與pH下，添加1 g/l yeast extract與/或peptone，探討yeast extract或peptone對於GI512菌株生長之影響。

3.4.2.7 生長氮源探討 (NH₄Cl, N₂, Urea, peptone)

本實驗探討菌株對於生長氮源的利用情形，以不含NH₄Cl並瓶頂空間曝氫氣之TA培養基與為一碳源葡萄糖5 g/l作為實驗控制組，添加1 g/l NH₄Cl、Peptone、Urea以及瓶頂空間曝氫氣，於最適溫度與pH下培養並監測生長，探討不同類型氮源（無機氮或有機氮）對於GI512菌株生長之影響。

3.4.2.8 硫酸鹽類還原能力測試 (Sulfate Reduction assay)

本實驗使用各種不同硫原子價數之硫酸鹽類進行菌株還原能力測試，其中文獻與預實驗結果顯示，添加較低濃度yeast extract對於菌株不同變因生長探討差異較為明顯 (Soh *et al.*, 1991)，故後續添加營養物質對於菌株生長影響實驗以較低濃度yeast extract提供輔因子。5 g/l葡萄糖為TA培養基單一碳源，添加0.5 g/l yeast extract以及1 g/l硫酸鈉 (Na₂SO₄)、亞硫酸鈉 (Na₂SO₃) 與硫代硫酸鈉 (Na₂S₂O₃) 於最適培養溫度與pH下監測生長情形 (Holt and Krieg, 1994)。

3.4.2.9 硝酸鹽還原能力測試 (Nitrate Reduction assay)

添加濃度過高硝酸鉀 (KNO_3) 對部分具硝酸鹽還原能力菌株有毒性 (Knapp, 1988)，故本實驗使用5g/l葡萄糖為TA培養基單一碳源，添加0.5 g/l yeast extract與1 %、0.1 %與0.01 %硝酸鉀，於最適培養溫度與pH下監測生長情形。

3.4.2.10 抗生素耐受測試 (Antibiotic susceptibility assay)

本實驗針對抗生素反應機制不同，選擇五種抗生素Ampicillin (影響細胞壁組成)、Kanamycin (影響轉譯)、Penicillin (影響醣肽合成)、Polymyxin B (影響多肽結構)與Vancomycin (影響細胞壁合成) (Baron, 1996)，並參考抗生素耐受實驗設計手冊 (Coyle, 2005)，設計不同抗生素濃度32、16、8、4、2、1與0.5 $\mu\text{g/l}$ ，以0.2 μm 孔徑之無菌濾膜過濾抗生素溶液後加入培養基，以培養總體積10 ml監測生長情形，觀察抗生素對於菌株為抑菌或殺菌反應，尋找抗生素最小抑制濃度 (Minimum inhibitory concentration; MIC)。

3.4.3 分子生物技術與菌相分析

(Molecular biological and microbial community assay)

3.4.3.1 染色體 DNA 萃取 (Chromosomal DNA extraction)

本實驗參考修改苯酚及氯仿萃取法 (Phenol/chloroform extraction method) 進行菌株染色體DNA的萃取 (Barns *et al.*, 1994)。操作前預先配製儲備溶液Solution I，成分為50 mM Glucose、25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 以及10 mM EDTA (pH 8.0)。配製反應Solution II，成分為0.02 g Lysozyme/ml Solution I，於4°C預冷。培養菌液經13000 rpm離心5分鐘蒐集菌體後，去除上層液以0.5 ml無菌水懸浮細胞。重覆上述清洗細胞步驟二

次後，加入500 μ l冰Soulution II於37°C反應30分鐘，使Solution II中Lysozyme充分溶解細胞壁。隨後加入25 μ l的20 %SDS界面活性劑上下搖晃一分鐘溶解細胞膜，加入20 μ l Proteinase K與10 μ l RNase置於37°C反應40分鐘，每5分鐘取出輕輕搖晃一次，充分混合藥劑並避免裸露DNA斷裂。之後以13000 rpm離心5分鐘取上層液至無菌的離心管，再加入同樣本體積(25:24:1; v/v) Phenol/chloroform/isoamyl alcohol溶液上下搖晃1分鐘，以13000 rpm離心5分鐘，此時會呈現三層物質—上層含純化DNA的水層、中間為RNA與蛋白質等等的有機物沉澱以及最底層有機溶劑，小心吸取上層液至無菌離心管並重複上述萃取步驟三次。最後加入上清液2.5倍體積的100 %分生級酒精，輕輕上下搖晃，若有白色棉絮狀DNA物質出現，以13000 rpm離心5分鐘，去除上清液後自然風乾，加入50-100 μ l TE Buffer (成分為每升去離子水含 Tris-Cl, 10 mM 與Na₂EDTA, 1.0 mM) 溶解沉澱物後保存於-20°C冰箱。若無白色棉絮狀物質出現，加入1/5倍體積7.5 M 醋酸銨與2.5倍100 %分生級酒精 (包含鹽類溶液體積) 置於-70°C冰箱再沉澱1小時以上，以醋酸銨配合酒精沉澱效果優於文獻研究添加醋酸鈉沉澱 (Grouse, 1987)。隨後以13000 rpm離心5分鐘去除上清液，以TE Buffer回溶DNA保存在-20°C。

3.4.3.2 DNA 濃度檢測與定量 (DNA quantification assay)

將萃取完成之DNA樣品稀釋適當濃度，以SHIMADZU UV mini-1240 spectrophotometer波長在260 nm與280 nm個別分析DNA與蛋白質或酚類之吸光值。核酸純度計算方式為260 nm吸光值/280 nm吸光值比值，Abs₂₆₀/A₂₈₀ 比值介於1.8至2.0為較佳DNA純度範圍，比值太大需降低酒精干擾，比值太小需再次沉澱去除蛋白質或萃取殘留酚干擾。而DNA濃度以260 nm吸光值依照公式 (3-4) 乘以稀釋倍數計算。

$$50(\text{ng}/\mu\text{l}) \times \text{OD}_{260 \text{ nm}} \text{ of sample} = \text{Concentration of DNA } (\mu\text{g}/\text{ml})$$

$$1 \text{ unit OD}_{260 \text{ nm}} = 50(\text{ng}/\mu\text{l}) \text{ of double - stranded DNA} \quad (3-4)$$

3.4.3.3 洋菜膠電泳 (Agarose gel electrophoresis)

使用洋菜凝膠 (Agarose) 凝固會產生多孔洞之特性可有效分離不同分子量的物質，故根據待分析DNA片段長度不同設計各種濃度洋菜凝膠 (Sambrook and Russell, 2001)，使用TAE Buffer (50X TAE buffer成分為每升去離子水含Tris base, 2.0 M、Acetic acid, glacial, 1.0 M與Na₂EDTA, 50 mM) 配製1 % (不同長度範圍片段適合之洋菜凝膠濃度為700 bp - 25 kb, 0.5 %、500 bp - 15 kb, 0.8 %、250 bp - 12 kb, 1.0 %、150 bp - 6 kb, 1.2 %與80 bp - 4 kb, 1.5 %。另外、明欣定序公司建議使用1.0 %濃度洋菜凝膠辨識度較佳) 洋菜凝膠約15分鐘凝固後，DNA樣品與6X loading dye依5 : 1比例混合注入膠片 Well，Loading dye組成為 Xylene Cyanol FF 與 Bromophenol Blue兩種不影響DNA泳動之物質做為指示劑調整電泳時間，以50 V電壓在TAE buffer中電泳25分鐘。之後以溴化乙錠 (Ethidium bromide ; EtBr) 溶液 (25mg/l in TAE buffer) 染色約10分鐘，置於UV照膠系統觀察與後續操作。

3.4.3.4 聚合酶鏈狀反應 16S rDNA 片段擴增

(Polymerase Chain Reaction)

根據上述兩實驗確認DNA純度與長度後，始進行聚合酶鏈狀反應。本實驗使用PCR反應器 (GeneAmp PCR system 2700, Applied biosystems, USA) 聚合酶鏈狀反應擴增菌株核糖體中16s rDNA片段。原理為添加兩段人工設計之專一性引子 (primers)，結構為小片段寡核苷酸 (oligonucleotides) 與選定擴增DNA片段兩端互補，實驗操作引子序列如Table 3-1 (Johnson, 1994; Marteinsson *et al.*, 2001; Muzer *et al.*, 2004)、組成DNA長鍊的四個單元去氧核苷三磷酸dNTP (dATP、dTTP、dCTP、dGTP) 以及進行複製的聚合酶Tag Polymerase，進行反覆升降溫產生變性 (Denaturation)、引

子黏合 (Annealing of primers) 與引子延伸 (Extension of primers) 反應，實驗設計的目標DNA會以2次方倍數增加提高片段DNA濃度。總反應過程中聚合酶作用影響產物品質，需調整引子黏合最佳溫度，藉由引子理論黏合溫度計算式 (3-5) 或使用梯度溫度PCR反應器 (Mycycler Thermal cycle PCR, Bio-rad, USA)，並以緩衝液調整pH值與調整Mg²⁺濃度維持聚合酶活性，PCR反應溶液成分與加溫程式如Table 3-2，使用引子為27F (5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3') 與1522R (5'-AAG GAG GTG WTC CAR CCG CA-3')。

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C) \quad (3-5)$$

Table 3-1 Nested-PCR primers used for application of V3-V5 region of 16S rDNA in this study (廖, 2004)

Primer ¹	Sequence (5'-3')	Specificity
27F	AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG	<i>Bacteria</i>
341F +GC ²	CCT ACG GGA GGC AGC AG	<i>Bacteria</i>
926R	CCG TCA ATT CTT TGA GTT T	Universal ³
1522R	AAG GAG GTG WTC CAR CCG CA	<i>Bacteria, Archaea</i>

(W=A, T; M=A, C; R=A, G)

1 : The numbers used for primer designation indicate the positions on the nucleic acid sense strands identical to the 5'-end of the forward primers (F) or complementary to the 3'-end of the reverse primers (R).

2 : GC-clamp = 5'-CGC CCG CCG CGC GCG GCC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G-3', Length = 37 nt.

3 : Specific for three domains; Bacteria, Archaea and Eucarya.

Table 3-2 Reagent and temperature program in PCR reaction

Components	Each conc.	Final conc.	Source
10x PCR buffer	-	1x (contain 15 mM Mg ²⁺)	QIAGEN
dNTP mix	10mM	200 μM of each dNTP	FINNZYMES
Primer F (27F)	10 pmole/μl	0.2 μM	Mission Biotech
Primer R (1522R)	10 pmole/μl	0.2 μM	Mission Biotech
Template DNA	-	20 ng/μl	
<i>Tag</i> Polymerase	5U/μl	1.0 U/μl	QIAGEN
dH ₂ O	To 25μl		

Reaction	Activation	Denaturation	Annealing	Extension	Final
Temp.(°C)	94	94	53 - 60	72	6
Cycle	1	30			1
Time(min)	3	1	0.5 - 1	0.5 - 1	10

3.4.3.5 變性梯度膠體電泳與巢式 PCR

(Denaturing gradient gel electrophoresis and Nested-PCR)

本實驗為瞭解經馴養之蜥蜴糞便中菌群結構消長情形，設計菌株 16S rDNA 中 V3-V5 區域，設計通用引子(Universal primers, 341f+GC:926R) 擴增各菌株相同長度片段，根據菌株間序列組成不同而核苷酸間氫鍵數不同，在尿酸為鹼性變性劑配製含梯度聚丙烯醯胺膠片中，發生斷鍵程度不同造成泳動差異進而達到分離鑑別功能。馴養蜥蜴糞便 (α -cellulose 5g/l 作為碳源於 55°C 厭氧環境) 呈穩定菌群後於培養期間依照天數採樣，監測纖維分解與醱酵產氫情形與 PCR-DGGE 進行菌群差異度分析。將 DGGE 電泳結果以 Quantity One 軟體 (Bio-rad, USA) 分析條帶相對位置轉換成為 1、0 組成陣列，隨後使用 Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, NTSYSpc 軟體 (Exeter Software, USA) 以非加權組平均法 (Unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA) 分析各採樣天數菌群相關性。

進行變性梯度膠體電泳前使用商用套件 Soil DNA isolation kit (MO BIO, USA) 進行菌群 DNA 萃取，此套件能有效去除土壤樣品中腐質酸物質，避免對於後續 PCR 步驟造成影響 (Niemi *et al.*, 2001)。目標序列片段擴增實驗使用巢式 PCR 技術，因引子專一性不足時會隨機與非目標 DNA 片段互補，故配合使用巢式 PCR 方法，設計較大片段 DNA 之引子 (27F : 1522R) 進行複製，再以選定引子 (341F : 926R) 複製大片段上之目標 DNA 片段，可提高產物純度與減少錯誤互補機率，引子序列於 Table 3-1，其中 341F 引子設計 GC-clamp，防止 DNA 序列於膠片中過度變性完全解鏈成單股 DNA，造成電泳辨識能力降低。

變性梯度膠體電泳設備 (DCode Universal Mutation Detection System, Bio-Rad, USA) 操作相關注意事項與膠片配製方法如以下所示：

- a. 鑄膠用玻璃片使用前檢查破損情形並以中性洗潔精與 70% 酒精清洗風乾，避免殘留膠塊與水滴造成干擾。
- b. 使用固定夾 (Clamp) 固定兩片鑄膠玻璃片，中間以墊片 (spacer) 間隔，若密合程度不佳以導熱膠 Silicone grease 填滿 spacer 與玻璃間隙，可有效防止後續分析產生微笑效應 (Smiling effect) 情況 (Brinkhoff and Hannen, 2001)。
- c. 鑄膠台組裝完成後檢查兩片玻璃底部平整，若鑄膠底部矽膠軟墊操作後未清洗完全會造成鹽類殘留，鑄膠時會產生氣泡干擾，可設計底膠避免此情形，配置方式根據 Table 3-3。
- d. 根據欲分析核酸片段長度配置不同濃度百分比聚丙烯胺膠片 (廖, 2004)，不同長度核酸序列適合聚丙烯胺膠片濃度為 300 bp - 1000 bp, 6.0 %、

200 bp - 400 bp, 8.0 % 與 100 bp - 300 bp, 10.0 %, 本研究進行 DGGE 電泳之序列片段約為 550 bp, 適合濃度 6.0 % 膠片。交聯劑, 聚合劑與變性劑配方比例一併整理於 Table 3-3。

- e. 梯度膠體灌注時需使用梯度輸送系統 (Bio-rad Model 475 Gradient Delivery System) 調整刻度至膠液體積相同刻度後, 依照高低濃度置於 System 兩端, 可以降低注射針筒溫度避免膠體快速凝固, 以穩定緩慢速度旋轉轉盤注入膠液防止變性梯度形成斷層。
- f. 灌注完成後, 小心放入齒模 (Comb) 避免產生氣泡後等待凝固, 為防止置入齒模時對於膠液造成擾動可以設計頂膠, 配置方式如 Table 3-3, 亦可降低核酸片段泳動起始時之干擾。
- g. 鑄膠完成移除齒模後, 以 TAE Buffer 清洗樣品槽內殘留膠塊且電泳槽需進行預熱, 避免溫度造成變性劑析出。
- h. PCR 產物與 6X loading dye 以 5:1 混合後注入等量核酸片段樣品, 60V 電壓 60°C 電泳 16 小時。
- i. 電泳結束以無菌 EtBr 溶液 (25 mg/l in TAE buffer) 染色 10 分鐘於 UV 照膠系統觀察與軟體分析。
- j. 選定欲分析之亮帶並使用無菌手術刀切割下膠條後置入離心管, 切割時需注意保護措施防止紫外光對於皮膚眼睛造成傷害。
- k. 以滅菌玻棒搗碎含亮帶之聚丙烯胺膠條, 加入等體積二次滅菌去離子水於 4°C 反應 12 小時將核酸片段由膠體萃取出來, 以不含 GC 基團引子擴增片段, 避免定序結果錯誤。

3.4.3.6 菌株 16S rDNA 定序 (16S rDNA sequencing)

根據上述實驗 PCR 片段擴增之 16S rDNA 產物使用 A₂₆₀/A₂₈₀ 核酸序列確認純度與洋菜凝膠電泳明確清晰亮帶後，委託明欣生物科技有限公司 (Mission Biotech Co. Ltd., Taipei, Taiwan) 進行序列定序。因核酸序列暴露於緩衝液與化學藥劑中造成部分破壞，定序後之序列兩端訊號較微弱故以 MEGA 4 軟體分析 Alignment Clustal 功能將 Forward 與 Reverse 兩段不同複製方向序列接合，其中 Reverse 片段需互補與反序再予以接合，修飾成較長之完整片段。

Table 3-3 Reagent of 6% polyacrylamide gel in DGGE method

a. Denaturant stock solution					
Order	Reagent	0%	70%		
1	40% Acrylamide/Bis (ml)	15	15		
2	50x TAE buffer (ml)	2	2		
3	Formamid (deionized) (ml)	0	28		
4	Urea (g)	0	29.4		
5	dH ₂ O	83	25.6		
Total volume 100 ml					
b. Cross-linking agent					
Ammonium persulfate (APS)					10%
c. Polymerizing agent					
Tetramethylethylenediamine (TEMED)					100%
d. Different concentration of gradient gel					
Gradient conc.	Top(0%)	35%	45%	55%	Bottom(70%)
0% stock sol. (ml)	1.5	7.1	4.5	2.7	0
70% stock sol. (ml)	0	5.4	8	9.8	1.5
Total volume 25 ml					
APS sol. (μl)	15	125	125	125	15
TEMED (μl)	3	12.5	12.5	12.5	3

* : Gradient gel: APS (10%): TEMED = 1000: 10 :1; Top and bottom gel: APS (10%): TEMED = 1000: 10: 2.

3.4.3.7 16S rDNA 序列比對 (16S rDNA BLAST)

將定序修飾後之序列上網至 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 比對 GeneBank 中序列資料以 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 搜尋 16S ribosomal RNA sequences database 相似序列，若勾選排除 Uncultured/environmental sample 可搜尋已命名菌株序列，後續進行親緣關係鑑定。

3.4.3.8 菌株親源樹圖繪製 (Phylogenetic tree)

將 NCBI 比對相關性接近之序列資料下載至 MEGA 軟體繪製親緣關係樹狀圖。參數設定部分 Distance matrix method 選擇 Neighbor-Joining method (Saitou and Nei, 1987; Tamura *et al.*, 2004)，Tree inference 選擇 Bootstrap test (1000 replicates)，Substitution model 選擇 Kimura 2-Parameter。

3.4.4 醱酵產物分析 (Fermentation product analyzed)

3.4.4.1 液相產物分析 (Liquid products analyzed)

葡萄糖醱酵過程會產生包括酸類與醇類產物，以高效液相層析儀 (High-performance liquid chromatography, Shimadzu, Japan) 測定糖類代謝與產物種類，並藉由離子交換管柱 *Transgenomic* COREGEL 87H3 (300 mm×7.8 mm) 分析並控制 35°C 恆溫；偵測器為紅外線偵測器 (RID-10A detector)；移動相 (Mobile phase) 為去氣處理之 0.008N H₂SO₄ 溶液 (0.6 ml/min)；樣品注射體積為 20µl，根據實驗需求選定標準品：葡萄糖、乳酸、乙酸、乙醇進行定量 (附錄一)。醱酵過程的揮發有機酸產物分析使用氣相層析儀 (Gas chromatography, Thermo Scientific, USA) 測定，並藉由毛細管柱 SEG BP20 (25 m×0.22 mm, 0.25 µm)，管柱升溫程式為起始溫

度 120°C 維持 3 min 後以 16°C/min 速率升溫至 200°C 維持 5 min；注射孔 (Injector) 溫度為 200°C；偵測器為火焰離子化偵測器 (flame ionization detector, FID) 溫度為 250°C；載流氣體 (Carrier gas) 為氮氣，氣體流量為 25 ml/min；樣品注射體積為 1 μ l。選定標準品為丙酮、乙酸、丁酸、乙醇、丁醇進行定量 (附錄二)。

3.4.4.2 氣相產物分析 (Gas chromatography analyzed)

非甲烷菌之厭氧菌代謝有機物過程，會伴隨產生生物氣 (Biogas) 其組成以二氧化碳與氫氣為主，實驗過程以醱酵管蒐集生物氣，以排水集氣方式 (裝置圖 Fig. 3-3) 計算總生物氣產氣量。採樣後以氣相層析儀 (GC-14B, Shimadzu, USA) 進行氣體成分分析，並藉由填充玻璃管柱 (2.1 m \times 3.2 mm, 填充物：Molecular Sieve 5A 60/80 mesh)，儀器設定參數為管柱溫度 50°C 恆溫；注射孔 (Injector) 溫度為 120°C；偵測器為熱傳導偵測器 (Thermal Conductivity Detector, TCD) 溫度為 140°C，電流 (Current) 為 60 mA；載流氣體 (Carrier gas) 為氮氣，氣體流量為 25 ml/min；樣品注射體積為 0.4 ml。配製標準品為以氮氣完全置換密閉厭氧瓶，以針筒打入不同比例體積標準氣體 (氫氣、二氧化碳)，之後將厭氧瓶以針筒洩壓達到同外界一大氣壓即完成，以上述儀器進行定量分析 (附錄三)。

3.4.4.3 醱酵平衡 (Fermentation balance)

將上述定量分析的液相與氣相產物代入檢量線，計算批次培養期間初始與最終時間點，每莫耳葡萄糖醱酵反應產生相對應莫耳數之氫氣、二氧化碳、醇類與揮發性有機酸，其中氫氣與二氧化碳為間段採樣方式，故以逐時間點累加計算反應完成總產量。氣態產物算式如 (3-6) (Fan *et al.*, 2008)，而液態產物以培養終點採樣分析計算，將產量除以該產物分子量即為所求。

$$V = V_0 \gamma_i + \sum V_i \gamma_i \quad (3-6)$$

where

V is the cumulative H_2 gas volumes at the current;

V_0 is the volume of headspace of vials;

V_i is the biogas volume discharged from the vials at the time interval (i);

γ_i is the fraction of H_2 gas discharged from the vials at the time interval (i).

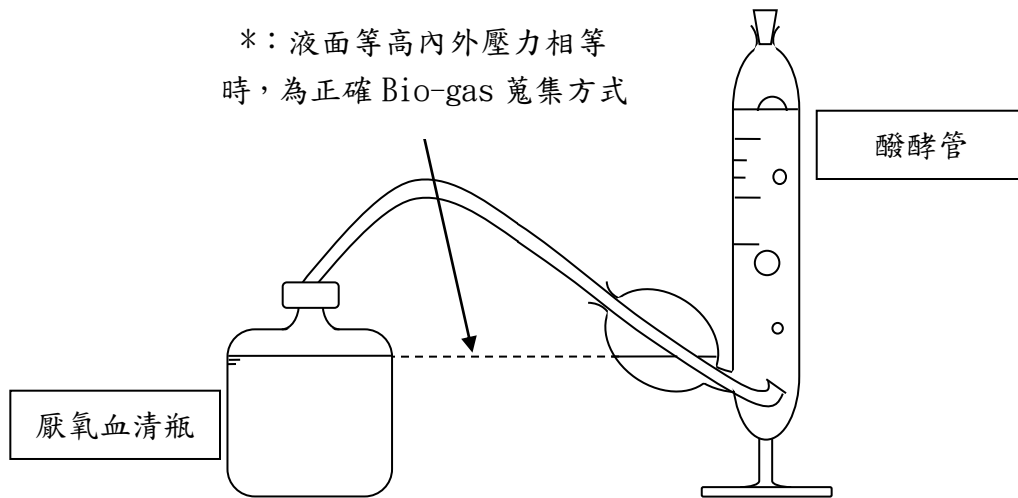


Figure 3-3 Experimental setup for biological hydrogen production test.

第四章 結果與討論

4.1 菌群分析

4.1.1 纖維水解產氫菌群馴養

本研究混合菌群來源為綠鬣蜥 (*Iguana iguana*) 糞便，以纖維濾紙 (Whatman No. 1) 為基質，厭氧培養於 55°C 馴養纖維水解菌群。實驗分析經過連續繼代培養增富後菌群可於 6 天將 5 g/l 纖維素完全分解並累積產氫 300 ml/l，對此穩定菌群進行菌相分析實驗。

4.1.2 Nested-PCR 擴增 16S rDNA 片段

使用蜥蜴糞便馴養之穩定纖維水解產氫菌群為菌種來源，以 5g/l 纖維濾紙作為 TA 培養基唯一碳源，於厭氧環境 55°C 培養，連續培養 120 小時並每 24 小時採樣，藉由 Soil DNA Kit 商用套件萃取每採樣點的菌群 DNA，分析 DNA (A260/A280) 純度平均為 0.9，顯示蛋白物質干擾太大，故使用醋酸銨/酒精再沉澱方法純化樣品後再次測量 DNA 純度，提高至平均 1.2。將純化後 DNA 樣品以巢式 PCR 方法擴增 16S rDNA V3-V5 區域目標片段，PCR 加溫程式設定為起始溫度 94°C 三分鐘、解鏈溫度 94°C 一分鐘、引子黏合溫度 55°C 一分鐘、延長溫度 72°C 一分鐘，以上三個步驟循環 30 次，最後溫度 72°C 六分鐘。文獻研究指出使用針對不同 specificity 的引子對，可以降低 PCR 過程 mismatch 的機會 (Hugenholtz and Goebel, 2001)。故加入引子對為 27F (Bacteria-specific) 與 1522R (Bacteria+Archaea-specific) 進行較大片段擴增，之後使用引子對 341F-GC (Bacteria-specific) 以及 926R (Universal-specific) 擴增小片段目標 DNA，以洋菜膠電泳分析所有片段擴增樣品為單一片段，如 Fig. 4-1。以此組 PCR 產物為後續分析之依據。

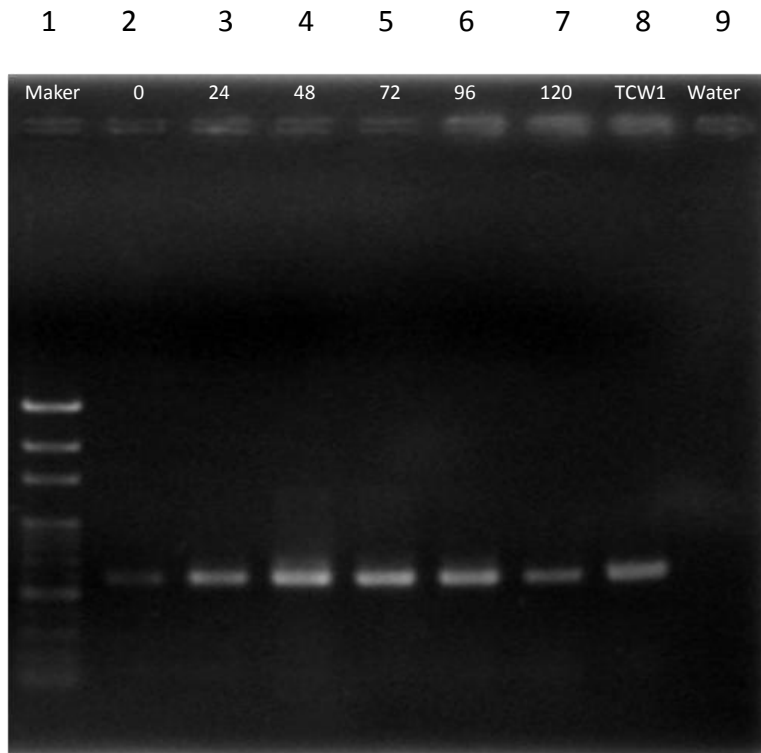


Figure 4-1 DNA concentrations and agarose gel electrophoresis profile of 16S rDNA fragments from lizard feces incubated with 5 g/L α -cellulose for 0, 24, 48, 72, 96, 120 hours and *Clostridium* sp. TCW1. Lane 1: maker means 1.5 kb, 1.0 kb, 900 – 100 bp, lane 2: 0 hour (concentration = 716.7 μ g/ml), lane 3: 24 hour (concentration = 1089.3 μ g/ml), lane 4: 48 hour (concentration = 803.2 μ g/ml), lane 5: 72 hour (concentration = 709.9 μ g/ml), lane 6: 96 hour (concentration = 764.3 μ g/ml), lane 7: 120 hour (concentration = 749.7 μ g/ml), lane 8: *Clostridium* sp. TCW1 (concentration = 684.5 μ g/ml), lane 9: water.

4.1.3 變性梯度膠體電泳 DGGE 菌群結構分析

本研究使用 4.1.2 巢式 PCR 片段擴增 16S rDNA 中 V3-V5 區域(約 500 bp) 樣品，目的在於藉由不同菌株於相同變異區段其序列差異較大作為分離依據，而根據 DGGE 操作原理設計引子 341F 含有 30 個 mer 以上 GC 基團 (GC-clamp)，可以避免於電泳時過度變性而完全解鏈為單股核苷酸而影響辨識。DGGE 電泳時需注意變性梯度範圍的操作條件，梯度的選定會影響核酸序列於膠片上的分布情形，故須選擇合適變性濃度範圍，提高辨識率與降低分析誤差。最初設計變性梯度範圍為尿素濃度 35%—55%，操作條件為 60°C，電壓 60 V 泳動 16 小時，結果如 Figure 4-2(a)所示，亮帶均集中在較高變性濃度(約 47%) 無法完全分離，可能部分序列 Tm 值差異非常接近產生聚集的情形，重新設計縮小變性梯度範圍為 45 %—55 %，可以使聚集的序列亮帶擴散，又可以避免膠片最底部亮帶的損失，如 Fig. 4-2(b)。因此後續實驗以變性範圍 45 %—55 % 結果為依據。

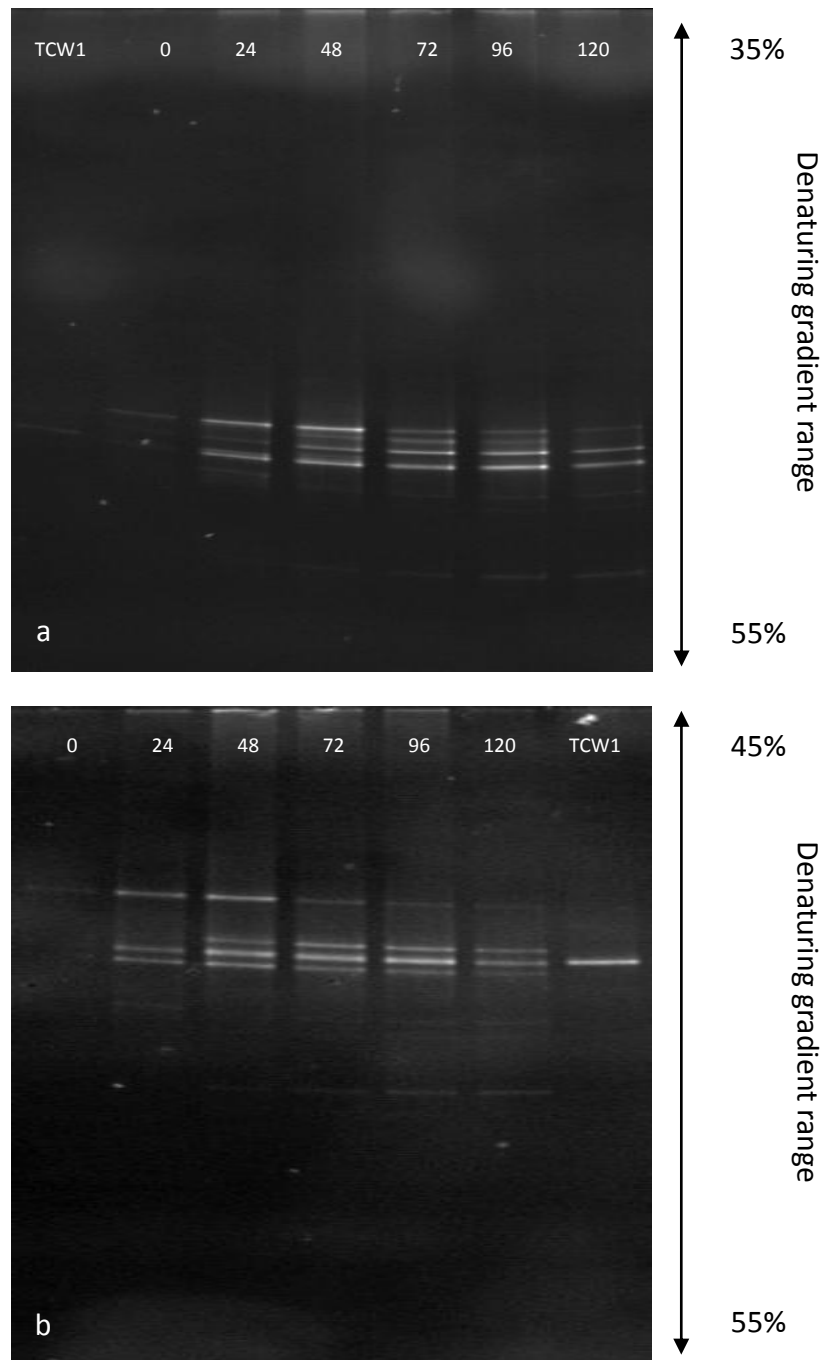


Figure 4-2 Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) profile of 16S rDNA fragments from lizard enteric mixed culture incubated with 5 g/L α -cellulose for 0, 24, 48, 72, 96, 120 hours at 55 °C. (a) Denaturing gradient range 35%-55%; (b) Denaturing gradient range 45%-55%. Denaturant reagent is formamid+ urea (70% = formamid: 1.12%(v/v), Urea: 294g/l).

4.1.4 菌群親緣分析

本研究根據 4.1.3 結果分析連續培養期間不同採樣時間點菌群變化相異度，繪製 Unweighted pair-group method using arithmetic averages; UPGMA 親緣樹圖，如 Fig. 4-3，結果發現隨著培養時間相似度指數（Coefficient）越高代表菌群趨於穩定。此混合菌群培養 72 小時後，菌群結構穩定下來。

將 DGGE 電泳結果膠片與培養期間監測纖維水解與產氫數據比較，如 Fig. 4-4 可觀察出不同消長情形，其中 OTU1 於 24 小時後即消失不見，取而代之為 OTU5 逐漸成為優勢，而 OTU2 與 OTU3 於 48 小時活性提高時為纖維水解作用最高期間，OTU4 - OTU8 活性於培養後期提高，判斷可能為產氫能力菌株。將上述之單一亮帶進行擷取並萃取膠塊中 DNA，此時 DNA 序列片段仍含有 GC-clamp，為避免序列鑑定時產生錯誤，以不含 GC 之 341F 與 926R 引子再次進行 PCR，並分析 DNA 純度與洋菜膠體電泳檢測為單一產品再送交定序。將定序結果繪製成親緣樹圖 Fig. 4-5，每個亮帶中的核酸序列代表為一個 OTU，因受限為 DGGE 技術辨識能力，僅以 500 bp 長度之序列資料無法判定菌種，菌屬部份可看出主要為 *Clostridium* 屬，由相似菌株的文獻可看出大部分微纖維水解混菌系統。

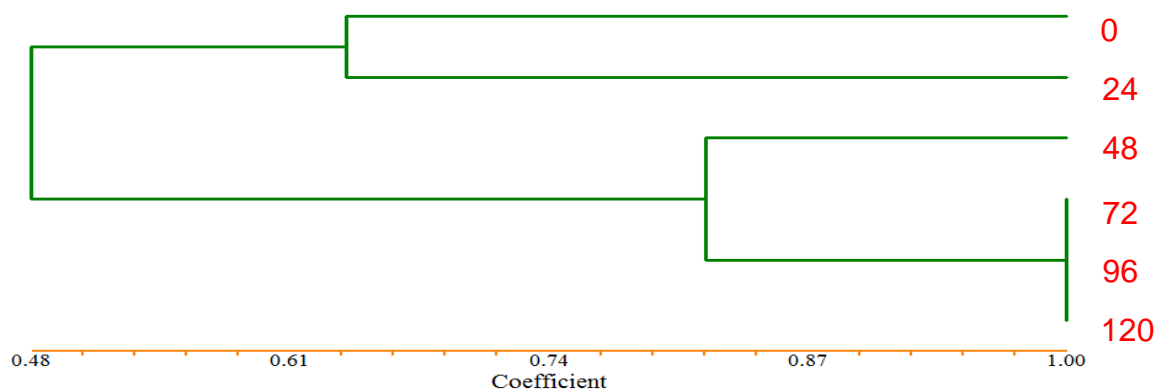


Figure 4-3 UPGMA dendrogram indicating similarity of DGGE pattern of 16S rDNA fragments from lizard enteric mixed culture incubated with 5 g/L α -cellulose for 0, 24, 48, 72, 96, 120 hours at 55 °C.

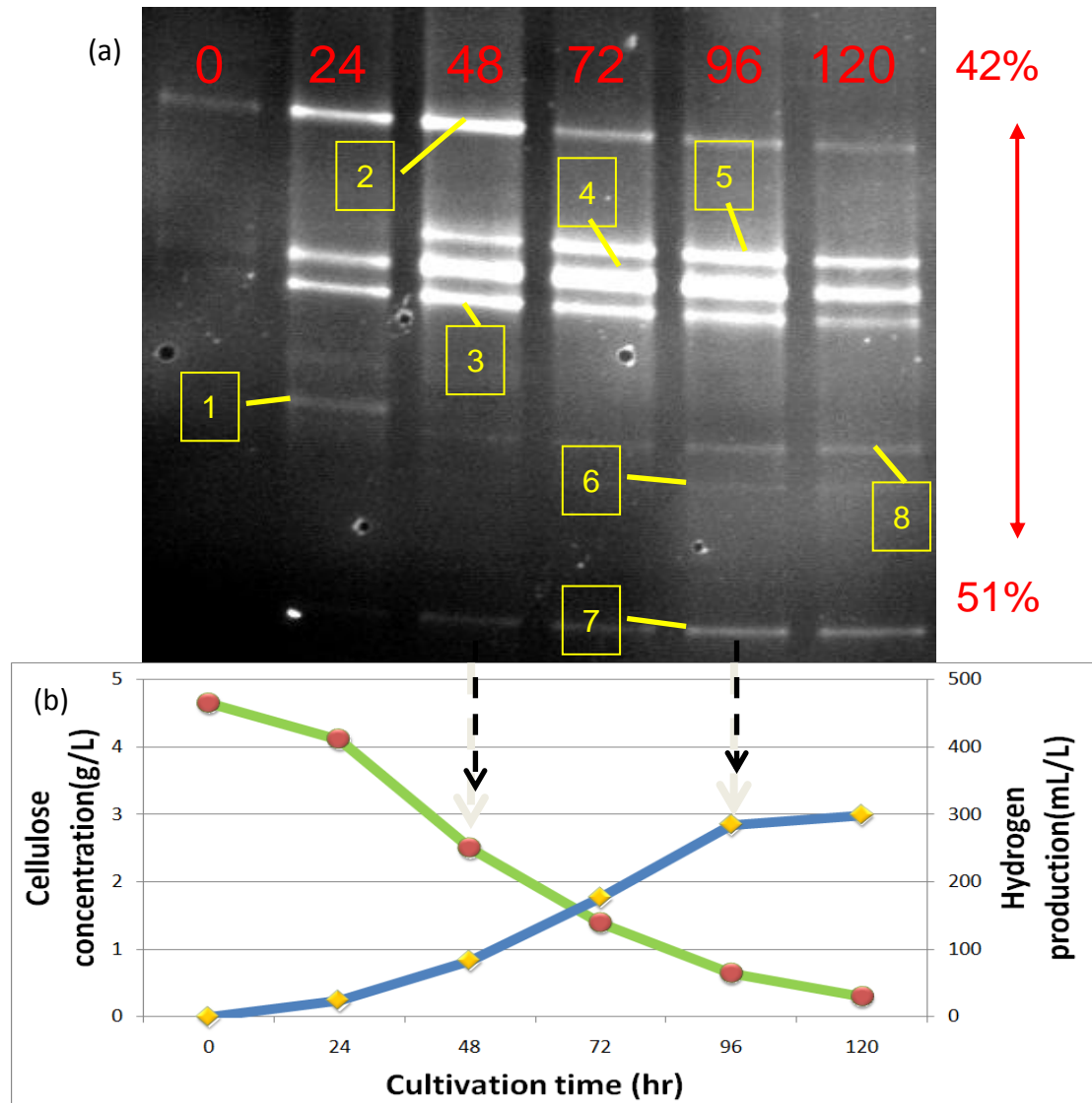


Figure 4-4 Microbial community structure analyses with cellulose degradation and hydrogen production from lizard enteric mixed culture incubated (a) DGGE profile of 16S rDNA fragments, (b) Cellulose degradation and Hydrogen production.

4.2 菌株分離純化

4.2.1 熱休克篩選

本研究為提升產氫效率，以熱休克方式 (Heat shock) 去除纖維水解產氫系統中的耗氫甲烷菌。以 5 g/l 濾紙纖維為 TA 培養基唯一碳源將增富培養後蜥蜴糞便為接種來源培養至對數生長期，以水浴法加熱菌液至中心溫度達 100°C，加熱處理 0、10、30、60 分鐘後接種至新鮮培養基培養，結果發現加熱 10 分鐘能有效抑制甲烷菌生長，觀察到甲烷產量大幅降低，而處理 30 分鐘後完全無甲烷產生。另外以位相差顯微鏡觀察發現接種時部分菌株形成孢子，另有許多微生物菌體破裂碎片散布在培養基，如 Fig. 4-6。

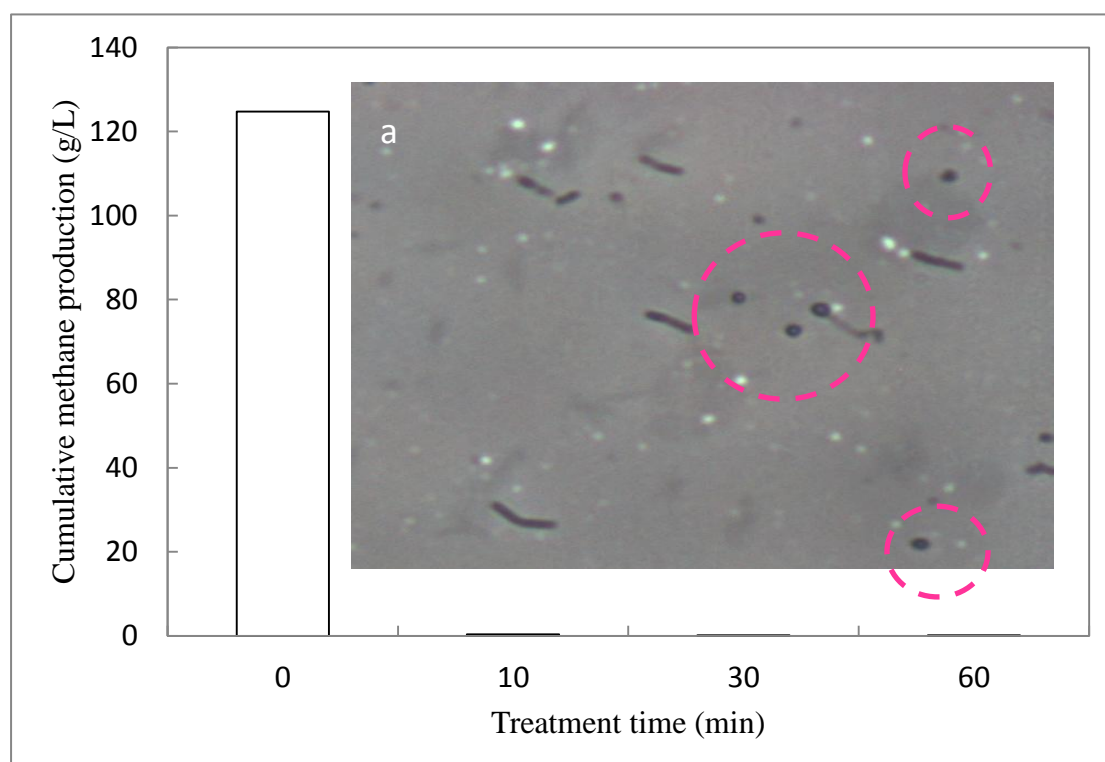


Figure 4-6 Methane production of lizard enteric mixed culture incubated with 5 g/l α -cellulose treated with heat shock for different times (water bath 100°C).

(a) The phase contract micrograph showed the mixed culture treated with 100°C for 30 min. Rod-shaped cells with terminal spores were shown.

4.2.2 厭氧滾管分離

參考 Hungate 厭氧滾管技術，以 2 g/l α -cellulose 或 glucose 為培養基碳源，於厭氧 55°C 下培養，嘗試分離纖維水解產氫系統中菌株期間，發現葡萄糖為碳源實驗組別培養三天後能以肉眼觀察到乳白色菌落，周圍伴隨微生物產氣所產生之氣泡，如 Fig. 4-7。根據菌落形狀、生長位置差異與菌落周圍氣泡大小，挑選出九個菌落，接種至 2 g/l 葡萄糖為碳源新鮮液態培養基繼代培養 72 小時後，以排水集氣法與 GC-TCD 分析各液態培養試管中氣體組成，其中菌落編號 5 號產氫能力較強(1365 ml hydrogen/l culture medium)，如 Fig. 4-8。將此菌株暫名為 GI512 進行後續生理生化特性探討與分子生物鑑定。

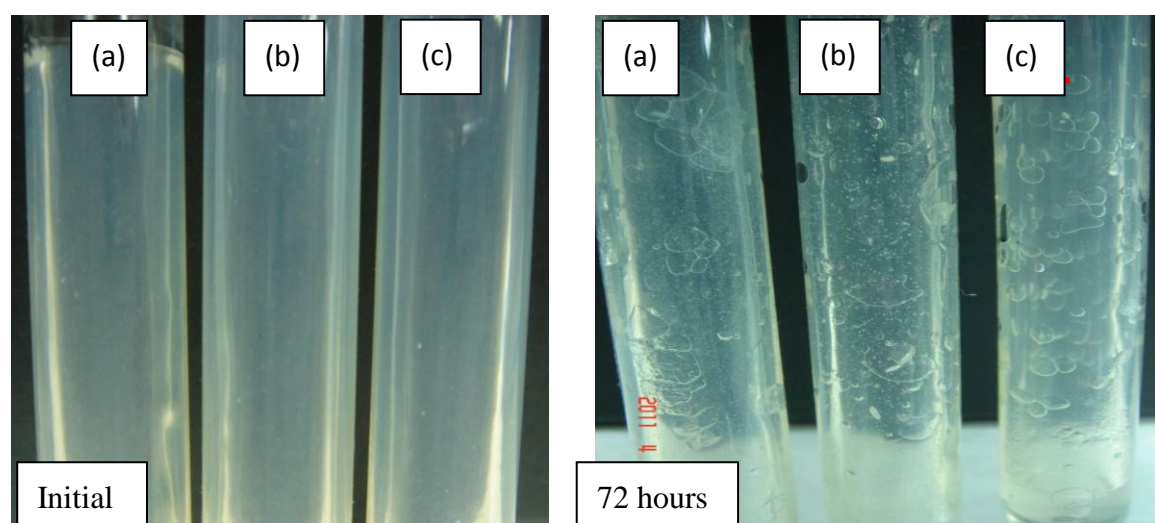


Figure 4-7 Isolation of H₂-producing anaerobes by roll tube technique. Solid culture medium with 2.5 % agar and 2 g/L glucose after 72 hours at 55 °C. After bubbles were found around colonies, indicating rigorous gas production.

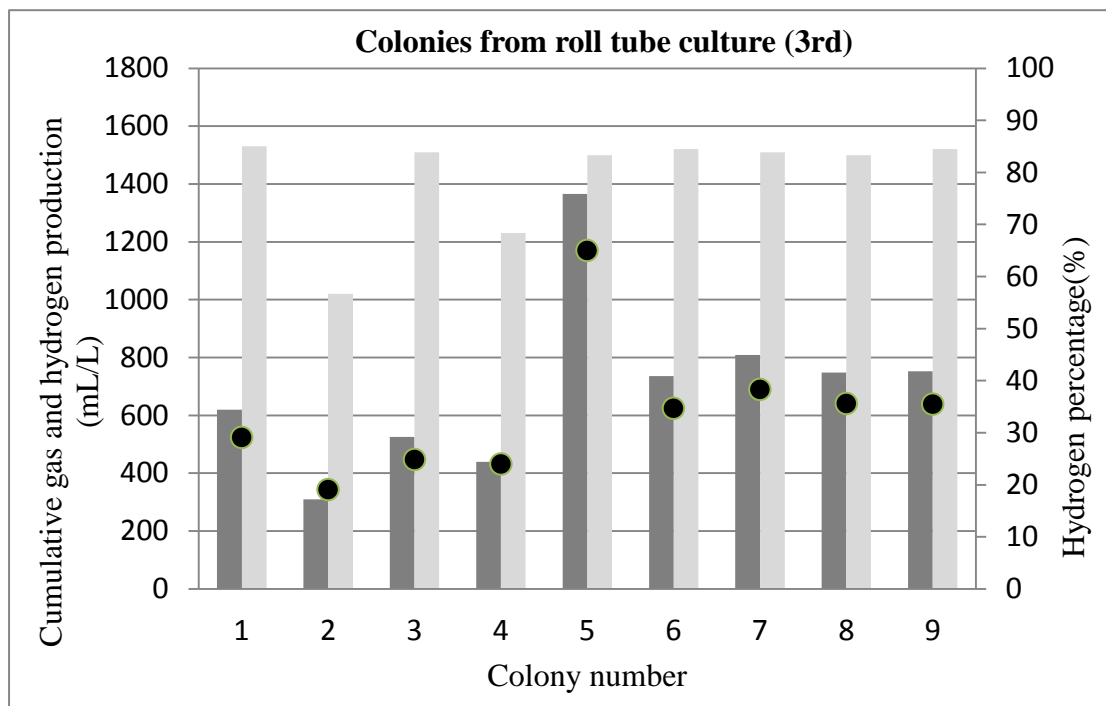


Figure 4-8 Cumulative gas production, hydrogen production and hydrogen percentage of isolated colonies from lizard feces growth on 5 g/l glucose concentration after 72 hrs.

4.2.3 產氫菌 GI512 親緣分析

本研究將菌株 GI512 萃取之染色體 DNA 以 PCR 擴增 16S DNA(約 1500 bp)，送交明欣生物科技公司定序，定序結果去除前後兩端訊號不佳部分，將 Forward 與 Reverse 兩端相接一起組成完整序列，至 NCBI 基因庫中比對 16S rDNA 相似菌株序列，以 MEGA 4 軟體繪製親緣樹圖，如 Fig. 4-9。根據親緣樹可發現 GI512 產氫菌株序列最接近 *Clostridium thermopalmarium* strain BVP 與 *Clostridium thermobutyricum* 兩株菌株，相似度最高為 98 %，判斷可能為相同菌株，但仍需進行後續生理生化特性測試是否為同種或亞種。GI512 菌株 16S rDNA 序列已上傳 NCBI，編號為 1544408 (附錄四)。

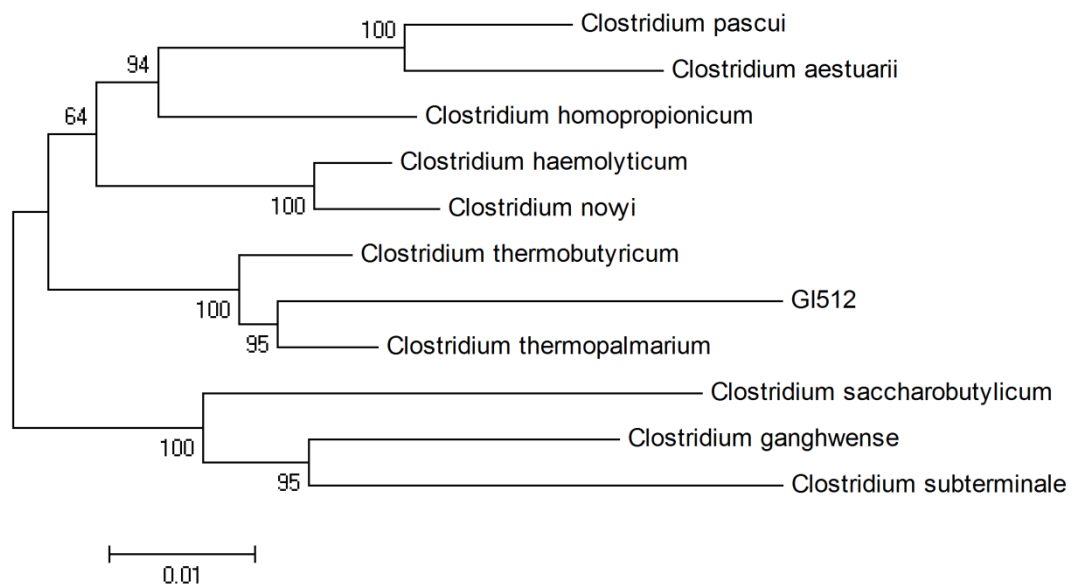


Figure 4-9 Dendrogram showing the interrelationships within hydrogen producing strain GI512 and closely related species. The tree was constructed by using the neighbor-joining method and bootstrap values calculated from 1,000 trees. Bar = represent 0.005 changes per nucleotide.

4.3 生理特性鑑定

4.3.1 菌相觀察

產氫菌 GI512 培養液外觀為白灰色混濁，Roll-tube 固態培養時為乳白色菌落。以 5 g/l 葡萄糖 TA 培養基液態培養，位相差顯微鏡可以發現菌體呈桿狀，大小約 $4.75\ \mu\text{m}(\text{L}) \times 1.25\ \mu\text{m}(\text{W})$ ，菌株末端會產生孢子 (Fig. 4-10 a)。以油鏡放大 2000 倍觀察，發現延長培養時間後菌株細胞內會出現不完整表面類似顆粒狀物質 (Fig 4-10 b)，可能與序列相似菌株 *Clostridium thermopalmarium* 文獻中提到會產生內含體 (Inclusion body)，於培養過程中會將無法利用營養物質、水分或有毒代謝物累積於細胞內形成內含體，而近來研究發現微生物內含體成分 Polyhydroxyalkanoate (PHA) 可提煉成為生物可分解塑膠原料，故進行後續 PHA 染色與分析。

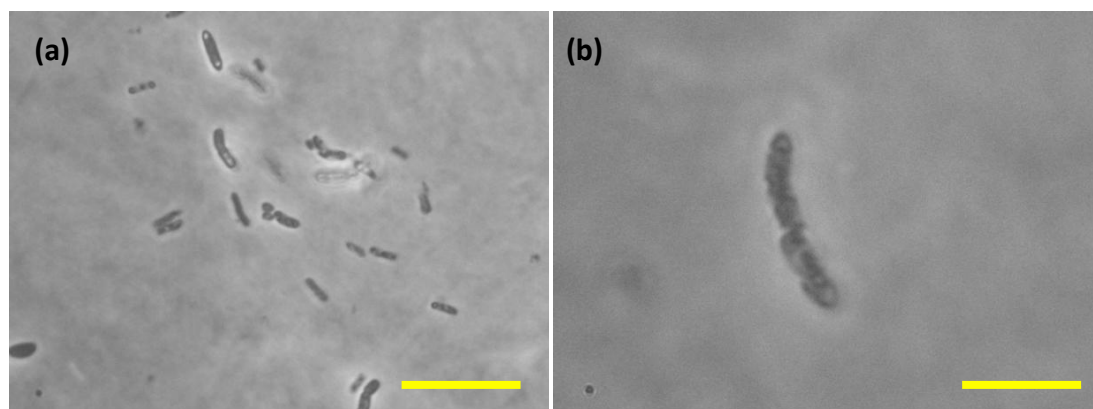


Figure 4-10 Phase-contrast micrographs of this isolate strain GI512. (a) Rod-shape cell and endspores. Bar = $20\ \mu\text{m}$ (b) Inclusion body-like structure. Bar = $3.0\ \mu\text{m}$.

以 6% 醋酸鈷進行負染色於穿透式電子顯微鏡放大 10,000 倍觀察，對於菌體細胞膜破壞較少，較容易觀察到完整菌株外觀，如 Fig. 4-11 (a) (b)，菌體呈現桿狀周圍無鞭毛結構。

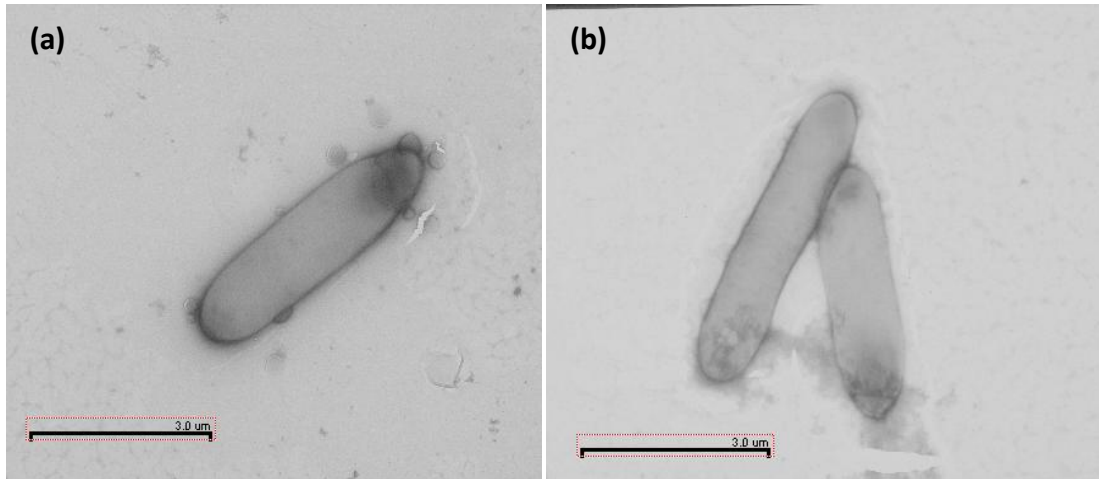


Figure 4-11 Transmission electron micrographs of hydrogen producing strain GI512 negative staining with 6% uranyl acetate. Bar = 3 μm.

4.3.2 革蘭氏染色

本研究將產氫菌株 GI512 進行革蘭氏染色。以 *Escherichia coli* (陰性菌) 與 *Staphylococcus aureus* (陽性菌) 為標準菌株培養至對數生長期後同時進行染色，染色後於顯微鏡底下觀察，發現菌株 GI512 呈現藍紫色，為革蘭氏陽性菌，如 Fig. 4-12。若非菌株活性最佳的對數生長期進行染色實驗，菌株老化造成細胞壁結構鬆散，會產生偽陰性反應。

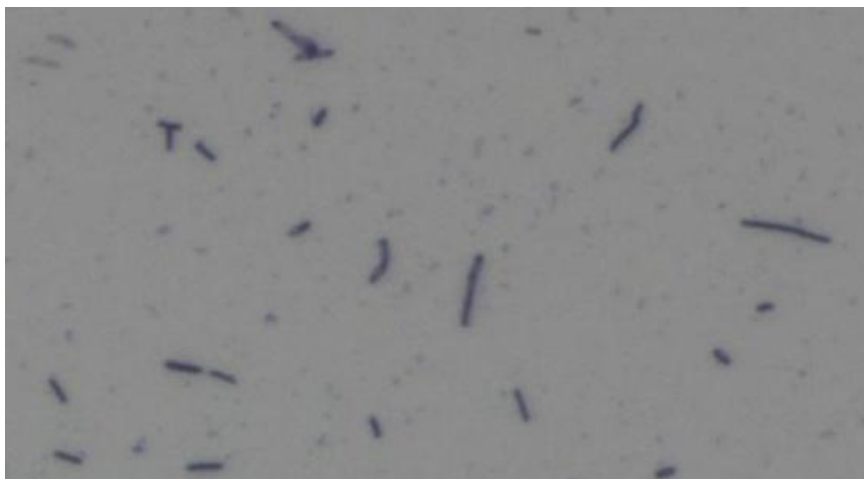


Figure 4-12 Micrographs of hydrogen producing strain GI512 with gram staining test.

4.3.3 莢膜染色

將菌株 GI512 進行莢膜染色。莢膜為菌株非必要結構，但大部分含莢

膜菌株為致病能力菌株，分泌的多醣成分莢膜有助於附著於宿主或防止免疫系統的吞噬作用。*Clostridium* 菌屬中有名的 *Clostridium perfringens* 食物中毒菌株，亦為厭氧生長產氣能力。以 *Escherichia coli* 為對照菌株一同進行染色，未發現細胞周圍有灰白色莢膜結構，如 Fig. 4-13。

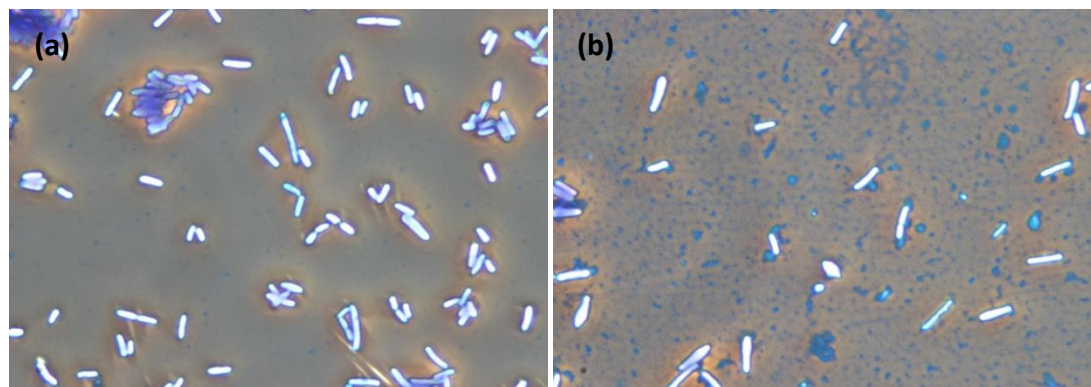


Figure 4-13 Micrographs of hydrogen producing strain GI512 with capsule staining test. Negative staining with copper(II) sulfate pentahydrate showing non-capsulated cell of (a) *E-coli* and (b) Hydrogen producing strain GI512.

4.3.4 PHA 染色

根據菌相觀察 4.3.1 中發現產氫菌 GI512 可能具有內含體結構，而聚羥基脂肪酸酯類 (PHA) 為微生物在代謝過量碳源基質時累積於內含體結構中的能量儲存物，可做為生物可分解塑膠之原料，是具經濟價值副產品之一。使用酯溶性的蘇丹黑 (Sudan black) 染劑以 *Escherichia coli* 為對照菌株與產氫菌 GI512 同時進行 PHA 染色，如 Fig 4-14。內含體結構為菌株培養後期才累積形成，故實驗使用穩定期菌體為實驗樣本，結果發現不具產 PHB 能力之 *E. coli* 呈現為番紅染劑的紅色胞質，菌株 GI512 細胞內有明顯黑紫色顆粒物質，判斷為 PHA 產生累積。隨後將分離菌株送至元智大學生物科技與工程研究所魏毓宏教授實驗室以氣相層析儀進一步分析此類 PHA/PHB 顆粒，0.01 g PHB 標準品出現於 GC 分析圖譜置留時間 3.6 分鐘位置 (Fig. 4-15 a)，而 GI512 樣品分析圖譜中未出現 PHB，但約 4.5 與 4.8 分鐘出現微量訊號，判斷為生成其他長鏈狀 PHA 物質。

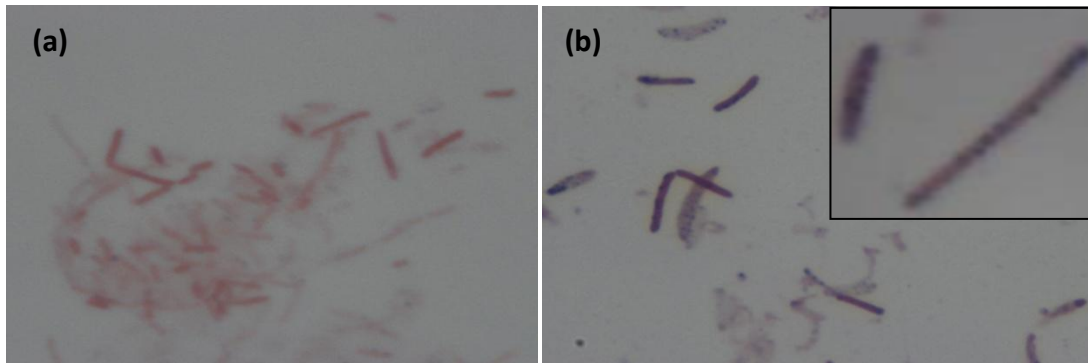


Figure 4-14 Micrographs of lipid structure with sudan black stain after stationary phase. (a)*E-coli* and (b)Hydrogen producing strain GI512 showing black granular in cell.

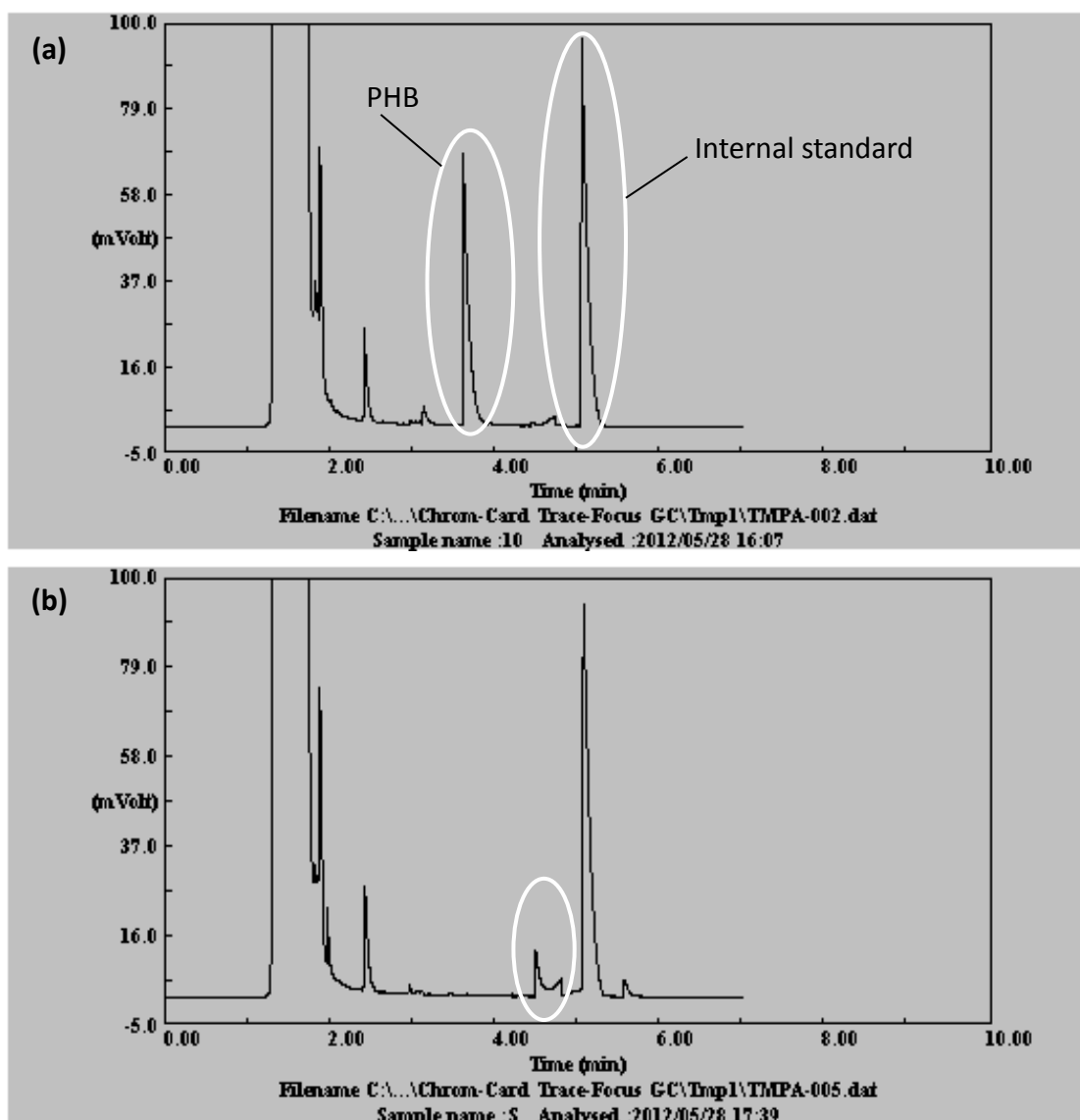


Figure 4-15 Chromatographic of lipid structure with hydrogen producing strain GI512. (a) PHB standard 0.01 g and retention time is 3.6 min (b) Hydrogen producing strain GI512 sample.

4.4 生化特性鑑定

4.4.1 Catalase 測試

微生物進行好氧呼吸會產生過氧化氫甚至超氧化物於細胞內累積，而好氧環境生長微生物會產生過氧化氫酶分解這些物質，否則會造成微生物死亡。而厭氧微生物並無產生此酵素能力，因此氧氣對此類微生物具有毒性。以大腸桿菌與金黃色葡萄球菌為對照菌株，滴入 3% H_2O_2 測試發現有氣泡產生，而產氫菌株 GI512 無氣泡產生，由結果可知 GI512 不含過氧化氫酶，是絕對厭氧生長之菌株。另外以好氧方式培養產氫菌 GI512 亦無生長情形，證實此菌株無法於好氧環境生長。

4.4.2 最適生長溫度

本研究以產氫菌株 GI512 批次培養至對數生長期後，OD 值約 0.8 時接種至 25, 35, 45, 55, 65°C 五種不同溫度進行實驗，以葡萄糖濃度 5g/l 為 TA 培養基碳源基質，連續培養三個世代，菌株適應溫度後予以測量吸光值，如 Fig. 4-16，最適生長溫度範圍於 35-55°C。以各批次之對數生長期計算比生長速率來看，於高溫環境生長情形較佳，判斷產氫菌 GI512 為嗜熱性菌株，且在 55°C 有最大比生長速率 0.238 hr^{-1} ，如 Fig. 4-17，與初始蜥蜴糞便混合菌群培養為相同溫度，而 65°C 時出現抑制生長的影響，非極端嗜熱微生物。

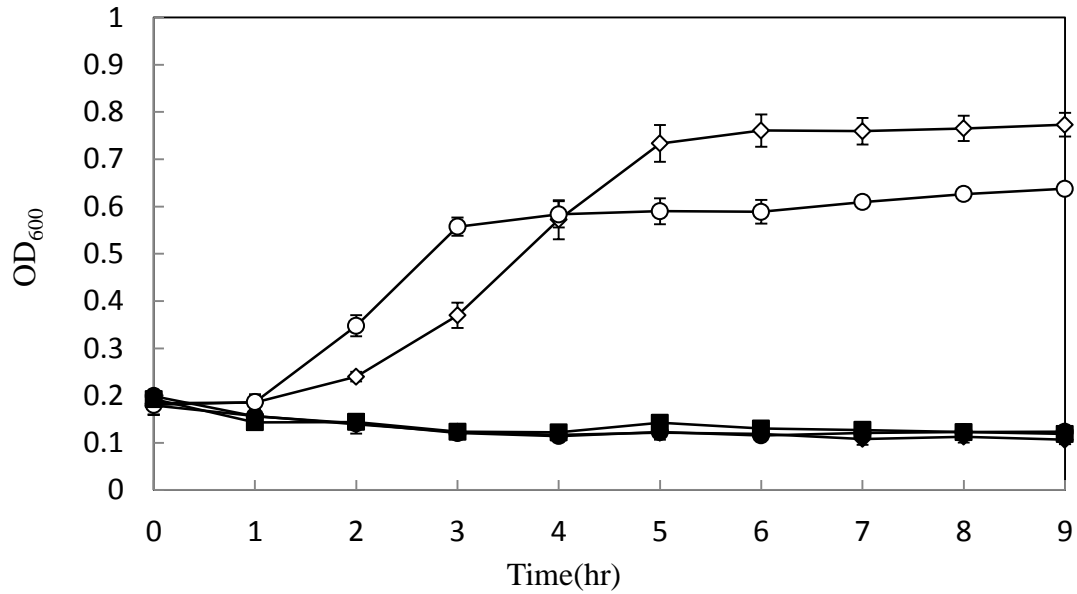


Figure 4-16 Temperature effect on growth of hydrogen producing strain GI512 incubated 5g/l glucose. Cell growth determined absorbance as optical density at 600nm. (◆):25 °C; (●):35 °C; (◇):45 °C; (○):55 °C; (■):65 °C.

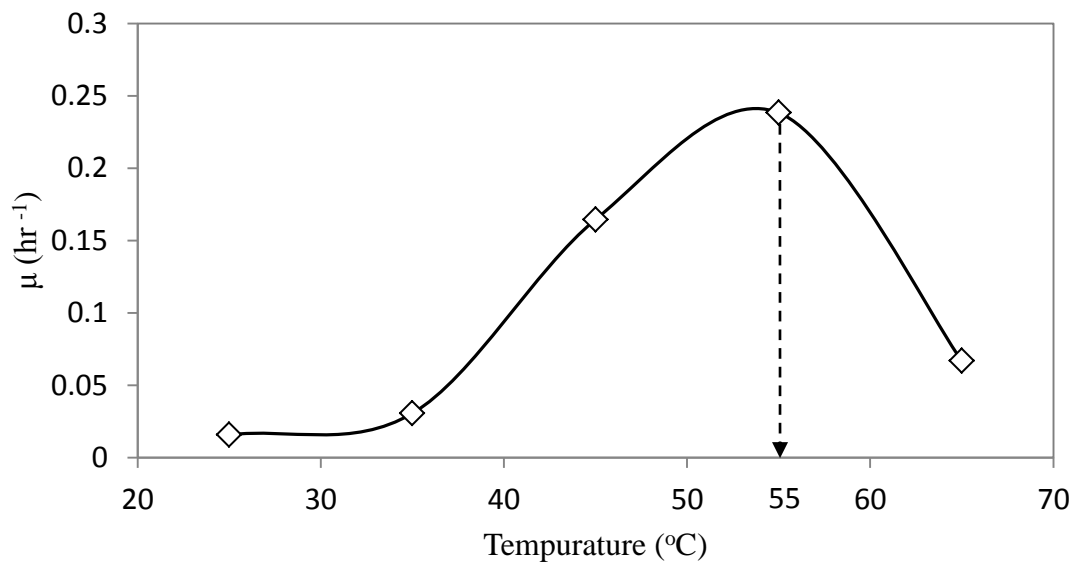


Figure 4-17 Specific growth rate of hydrogen producing strain GI512 in different temperatures between 25 and 65 °C. Optimal growth occurs at 55°C.

4.4.3 最適生長 pH

產氫菌株 GI512 最適 pH 測試如 Fig. 4-18，最適 pH 生長範圍於 6.3-8.8。菌株於過於極端 pH 環境生長表現較為不佳，中性偏鹼有最大比生長速率 0.287 hr^{-1} ，結果於 Fig. 4-19。各批次培養分別測試初始與最終 pH，最初 pH 7.12 培養後降至 5.73，而最初 6.34 培養後降至 5.63，顯示產氫菌株 GI512 培養過程中會伴隨產生酸性副產物。

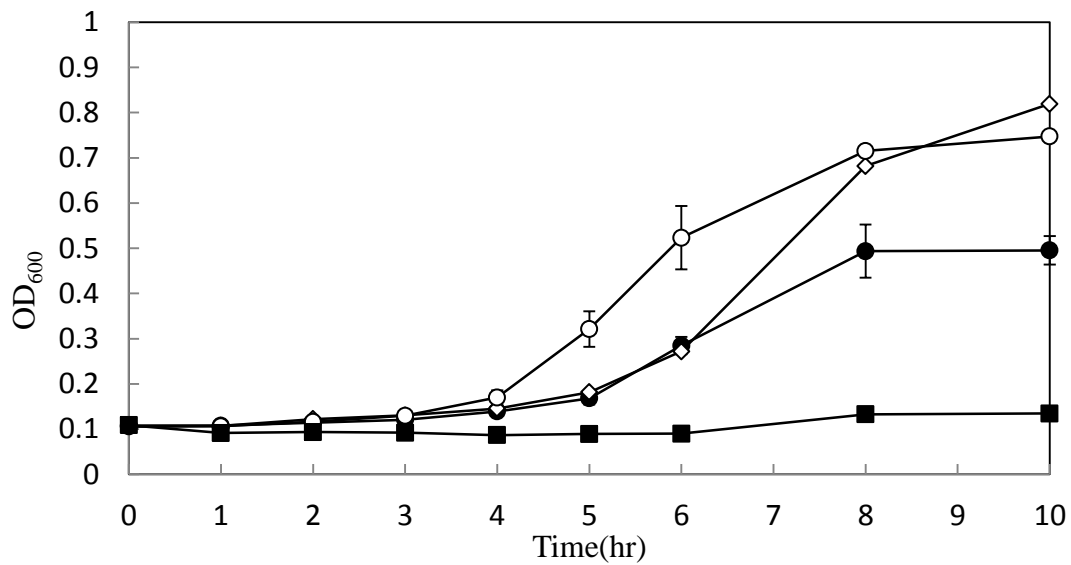


Figure 4-18 Initial pH effect on growth of hydrogen producing strain GI512 incubated 5g/l glucose. Cell growth determined absorbance as optical density at 600nm.(●):pH 6; (◇):pH 7; (○):pH 8; (■):pH 9.

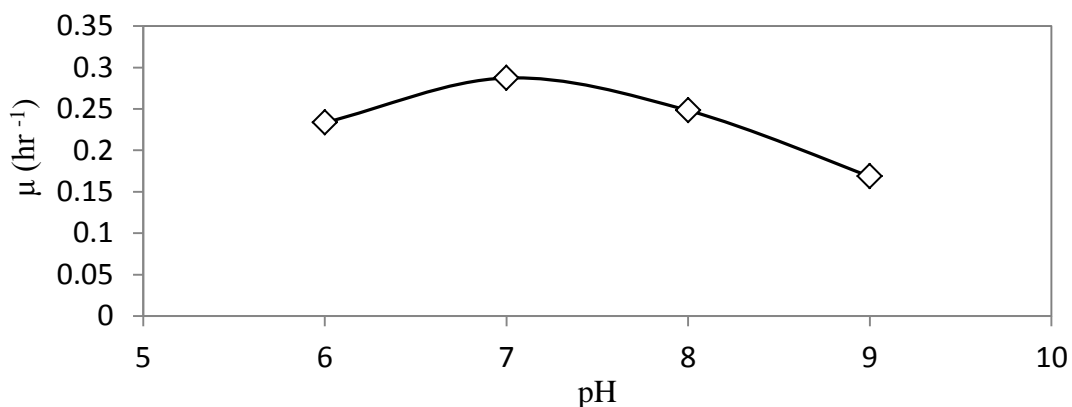


Figure 4-19 Specific growth rate of hydrogen producing strain GI512 in different pH between 6.34 and 8.82. Optimal growth at 7.12.

4.4.4 最適基質濃度

本研究探討之基質為葡萄糖，測試不同葡萄糖濃度對於產氫菌株 GI512 生長影響，結果如 Fig. 4-20，發現 5 g/l 葡萄糖濃度以上菌株即有明顯生長，隨著濃度提高比生長速率略微下降，當濃度提高至 50 g/l 仍無明顯的抑制情形，而最大比生長速率為 0.69 hr^{-1} ，於 5 g/l 培養條件下，如 Fig. 4-21 所示，由結果可知此菌株對於基質耐受濃度廣泛。

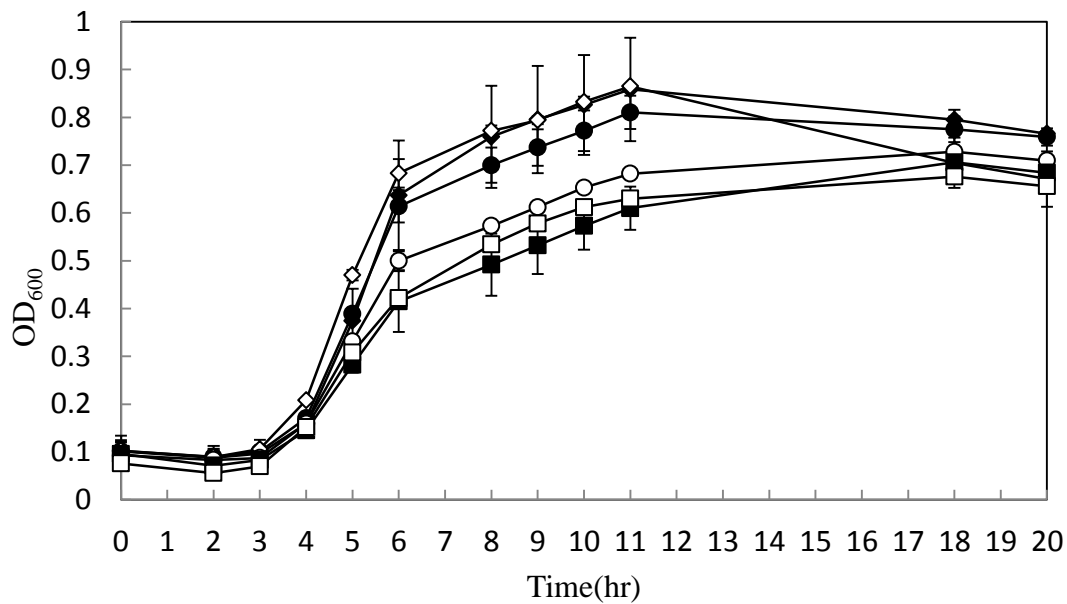


Figure 4-20 Different glucose concentrations effect on growth of hydrogen producing strain GI512. Cell growth determined absorbance as optical density at 600nm. (◆):5 g/l; (●):10 g/l; (◇):20 g/l; (○):30 g/l; (□):40 g/l; (■):50 g/l.

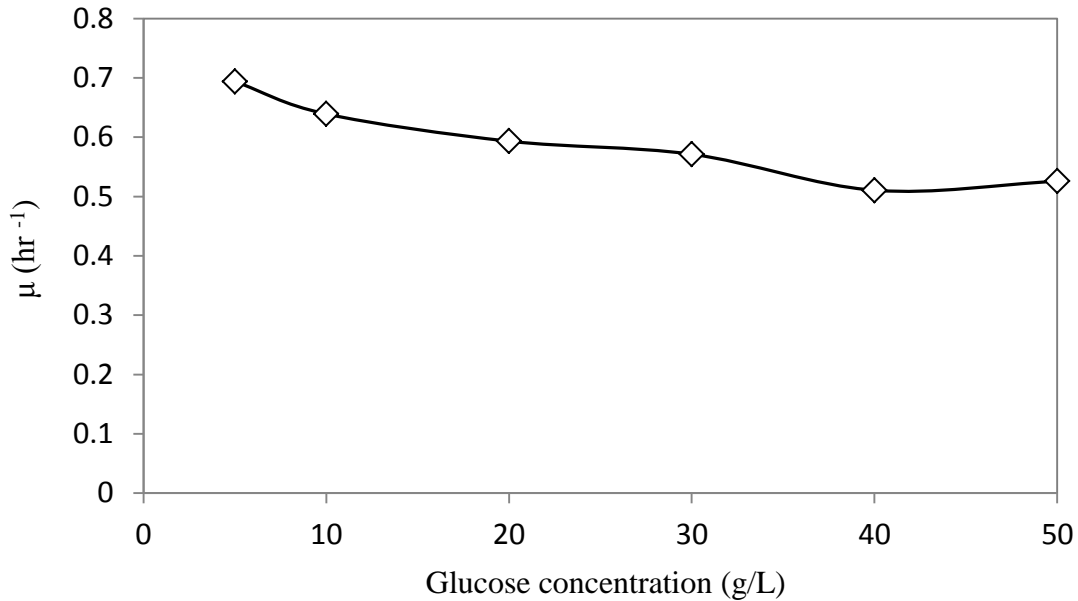


Figure 4-21 Specific growth rate of hydrogen producing strain GI512 in different glucose concentrations between 5 g/l and 50 g/l. Optimal growth at 5 g/l.

4.4.5 碳源基質利用種類

使用 API20A 與 AN Microplate 兩組快速檢定的商業套件測試產氫菌株 GI512 能夠代謝的基質種類。API 20A 可分析的項目包括 L-tryptophane、urea、D-glucose、D-mannitol、D-lactose (bovine origin)、D-saccharose (sucrose)、D-maltose、salicin、D-xylose、L-arabinose、gelatin(bovine origin)、esculin、ferric citrate、glycerol、D-cellobiose、D-mannose、D-melezitose、D-raffinose、D-sorbitol、L-rhamnose 與 D-trehalose 等 20 種。而 AN Microplate 基質種類有醣類、酯類、有機酸與蛋白質類共 95 種。API 20A 結果顯示除尿素為陰性反應外，其餘皆為可用基質。而 AN Microplate 則可以利用 α -D-lactose、 β -methyl-D glucoside、salicin、acetic acid、formic acid、fumaric acid、glyoxylic acid、 α -hydroxybutyric acid、 β -hydroxybutyric acid、itaconic acid、propionic acid、pyruvic acid、pyruvic acid methyl ester、D-saccharic acid、succinamic acid、succinic acid、succinic acid mono-methyl ester、urocanic acid、alaninamide、L-alanine、L-alanyl-L glutamine、L-alanyl-L histidine、L-alanyl-L

threonine、L-asparagine、L-glutamic acid、L-glutamine、glycyl-L aspartic acid、glycyl-L glutamine、glycyl-L methionine、glycyl-L proline、L-methionine、L-valine plus L-aspartic acid、2'-deoxy adenosine、inosine、thymidine、uridine and thymidine-5'-mono-phosphate。因為此菌株分離至蜥蜴糞便的纖維水解產氫系統，另以纖維素（Cellulose）與木聚糖（Xylan）為基質進行批次培養，發現無降解與生長情形，產氫菌株 GI512 不具木質纖維素分解能力。

4.4.6 氮源基質利用種類

本研究設計不同氮來源對於菌株 GI512 影響，其中分為無機氮源的氮氣、氨氮以及有機氮類的 Peptone 與尿素，而配製 TA 培養基時瓶頂空間氣體也根據實驗需要使用氫氣置換，培養結果如 Fig. 4-22 所示，發現無論有機或無機氮源接有助於生長，但尿素與氮氣批次實驗出使有些微生長即停止，不具固氮與尿素代謝能力，而仍有生長判斷是 yeast extract 提供部分營養而造成初期吸光值上升情形，故後續探討 TA 培養基 yeast extract 與 peptone 利用測試。

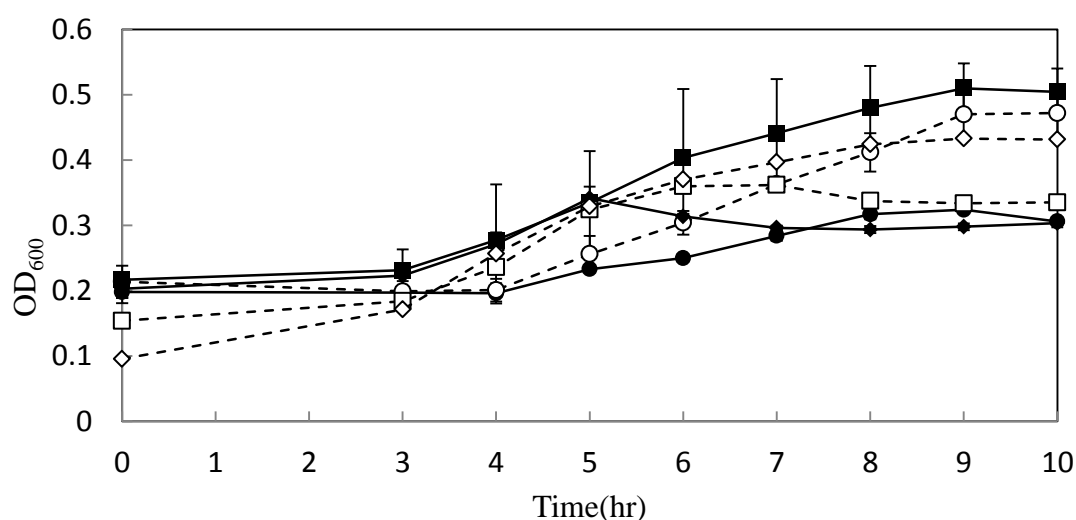


Figure 4-22 Different nitrogen source effect on growth of hydrogen producing strain GI512. Cell growth determined absorbance as optical density at 600nm. (◆): Without N source; (●):N₂; (◇): TA medium; (○): NH₄Cl; (□): Urea; (■): Peptone.

4.4.7 Yeast、Peptone 利用測試

TA 培養基中的 yeast extract 與 peptone 為複雜成分營養物質，分別提供輔因子 (Co-factor)、蛋白質或生長激素等來源，文獻提到部分土壤微生物能以多種維生素代替 yeast extract 能夠提高微生物生長與產氫能力 (Koku *et al.*, 2003)。故本研究探討添加 yeast extract 與 peptone 對於產氫菌株 GI512 生長之影響，結果如 Fig. 4-23，發現 yeast extract 為菌株 GI512 生長所必須物質，而不添加 peptone 對於生長影響不明顯，而空白組（兩種都不添加，但有添加 TA 培養基配方之維生素）菌株不生長，故 yeast extract 提供產氫菌株 GI512 無法被取代的生長必須營養。後續硫酸鹽與硝酸鹽還原測試，因為添加 1 g/l yeast extract 對於探討生長影響結果不明顯，經預實驗結果改為添加 5 g/l 進行測試。

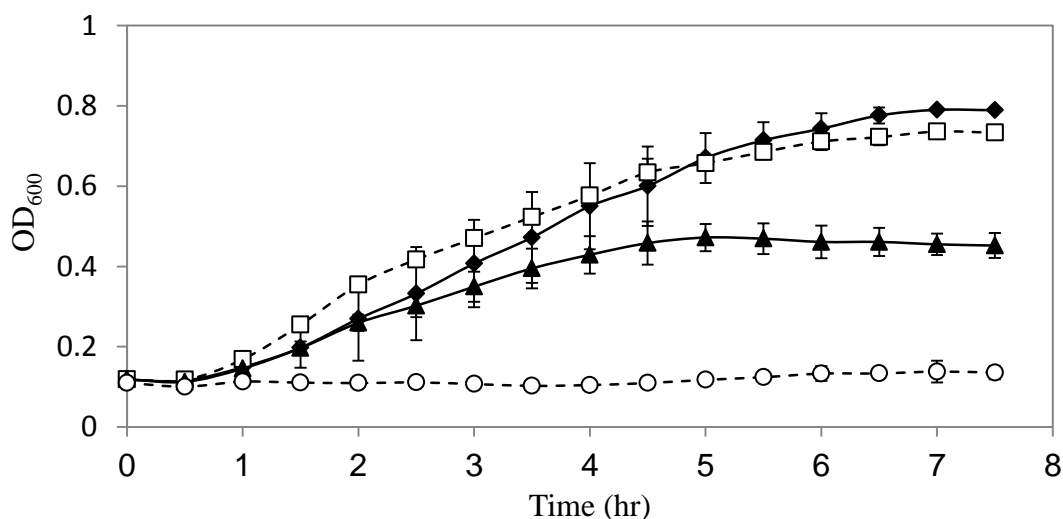


Figure 4-23 Growth curve of hydrogen producing strain GI512 culture with yeast extract and/or peptone. Carbon source is 5g/l glucose. (□):TA medium-With yeast extract and peptone; (◆):1 g/l Yeast extract ; (▲):1 g/l Peptone; (○):Without yeast extract and peptone.

4.4.8 硫酸鹽還原測試

本研究探討產氫菌株 GI512 對於硫酸鹽、亞硫酸鹽以及硫代硫酸鹽還原能力，於 5 g/l 葡萄糖為碳源之 TA 培養基中添加 1 g/l Na_2SO_3 、 Na_2SO_4 與 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 監測生長。培養結果如 Fig. 4-24，發現產氫菌株無法利用此三種硫酸鹽類，對於生長皆無促進影響，且添加亞硫酸鹽 Na_2SO_3 會抑制菌株生長，不具還原硫酸鹽能力與 *Clostridium* 菌屬生理生化特性相同。

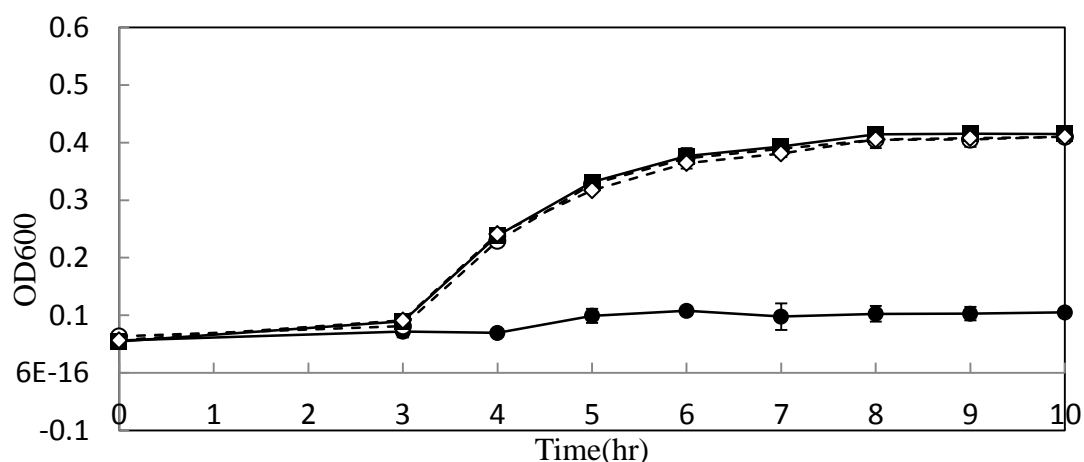


Figure 4-24 Growth curve of hydrogen producing strain GI512 in different sulfate with 0.5g/L yeast extract and carbon source 5 g/l glucose. (◇):TA medium; (●):1 g/l Na_2SO_3 ; (○):1 g/l Na_2SO_4 ; (■):1 g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

4.4.9 硝酸鹽還原測試

本研究測試產氫菌株 GI512 硝酸鹽還原能力，探討是否具厭氧脫硝能力。而文獻中提到部分脫硝能力菌株於太高濃度硝酸鹽 (0.1 g/l) 會對細胞產生毒性抑制生長 (Knapp, 1988)。故本實驗以 5 g/l 葡萄糖為 TA 培養基碳源，添加 0.5 g/l yeast extract 與 1 g/l、0.1 g/l 與 0.01 g/l 不同濃度 KNO_3 對於菌株生長之影響，結果如 Fig. 4-25，發現三種濃度 KNO_3 皆不促進菌株生長，且高濃度批次實驗亦無抑制情形，顯示產氫菌株 GI512 無具硝酸鹽還原能力且對於硝酸鹽濃度耐受範圍大。

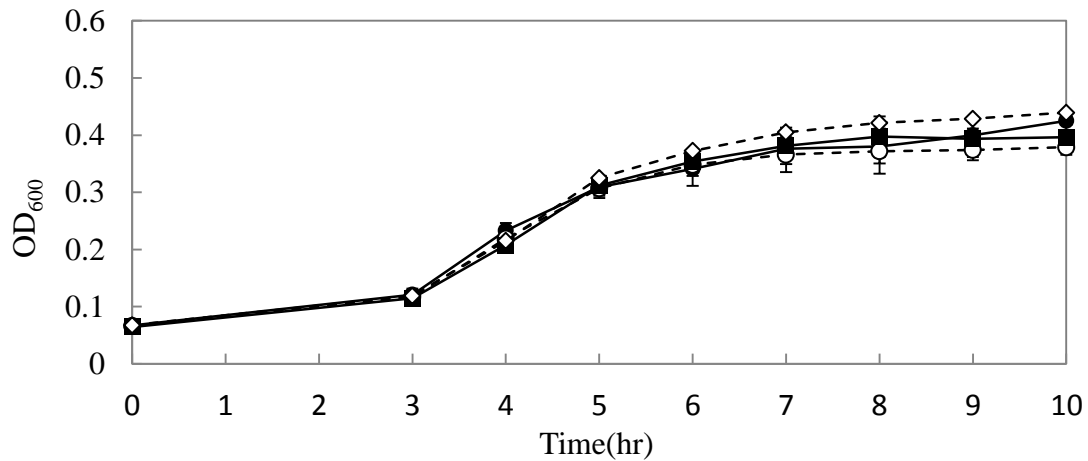


Figure 4-25 Growth curve of hydrogen producing strain GI512 in different concentration KNO₃ with 0.5g/L yeast extract and carbon source 5 g/l glucose. (◇):TA medium; (■):0.01%,KNO₃; (○):0.1%,KNO₃; (●)1%,KNO₃.

4.4.10 抗生素耐受測試

本研究探討各種不同抑制機制抗生素 Ampicillin、Kanamycin、Penicillin、Polymyxin B 與 Vancomycin 對於產氫菌株 GI512 生長的影响，設計不同抗生素濃度 32、16、8、4、2、1 與 0.5 μ g/l，以 0.2 μ m 孔徑之無菌濾膜過濾抗生素溶液後加入培養基，根據文獻中抗生素對於微生物生長產生明顯抑制的最小濃度添加量為最小抑制濃度 (Minimum inhibitory concentration; MIC)，結果如 Fig. 4-26 所示，發現針對細胞壁組成影响的 Ampicillin 殺菌效果最佳，Penicillin 與 Vancomycin 則只有延長遲滯期，達抑菌效果。影响細胞膜通透性的 Polymyxin B 低濃度即具有殺菌效果，而 Kanamycin 能夠抑制細胞轉譯，對於此菌株需較高濃度才達到殺菌效果。各抗生素 MIC 如 Table 4-1。

Table 4-1 Antibiotic susceptibility minimal inhibitory concentration of strain GI512

	Ampicillin	Kanamycin	Penicillin	Polymyxin B	Vancomycin
MIC (μ g/ml)	0.5	4	8	2	4

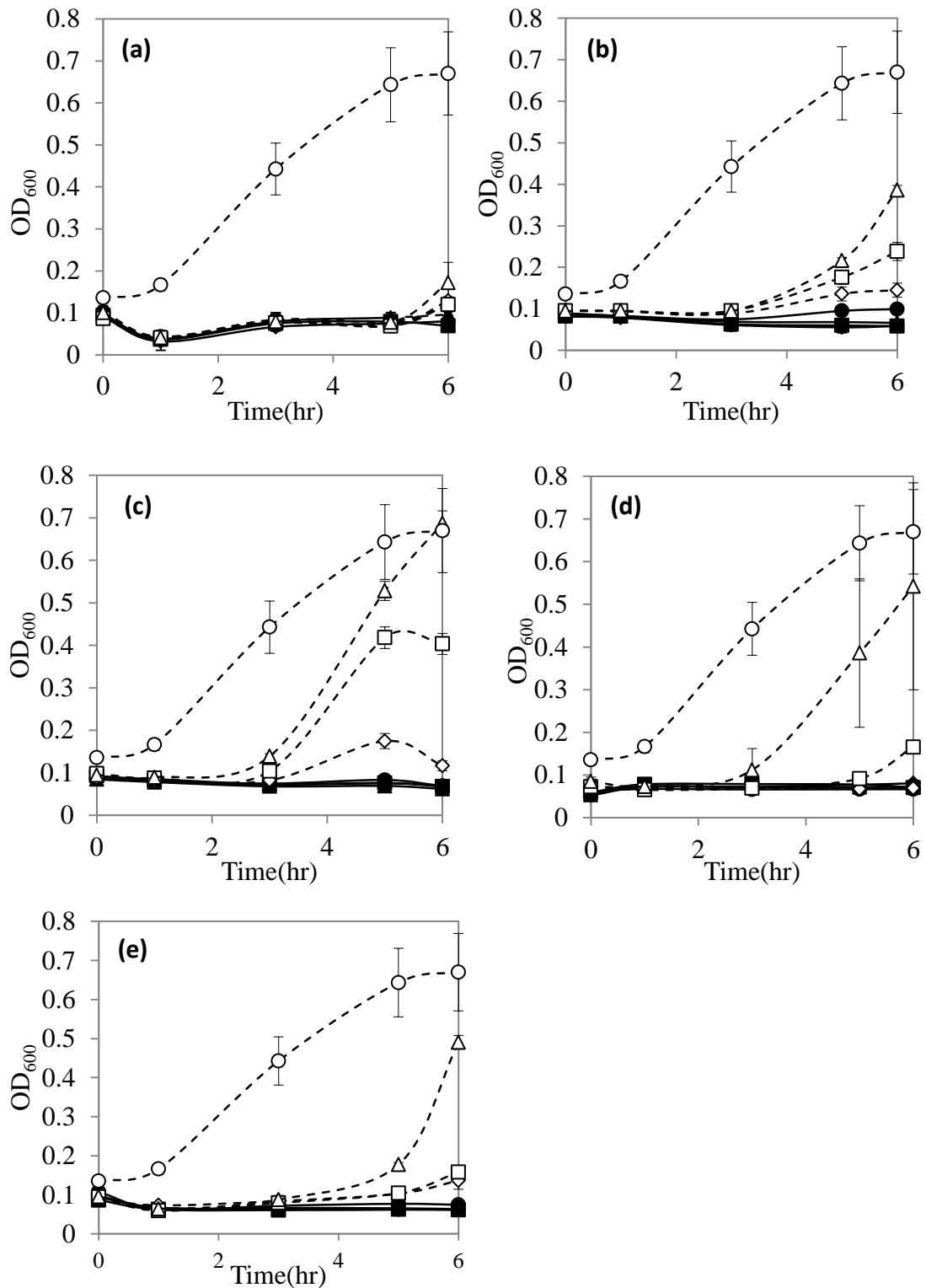


Figure 4-26 Growth curve of hydrogen producing strain GI512 in different antibiotics. (a)Ampicillin, (b)Penicillin, (c)Kanamycin, (d)Polymyxin B, (e)Vancomycin. Symbols: (◆):32 μg/ml; (■):16 μg/ml; (▲):8 μg/ml; (●):4 μg/ml; (◇):2 μg/ml; (□):1 μg/ml; (△):0.5 μg/ml; (○):Blank .

4.5 菌株特性整理

Clostridium sp. GI512 進行 16S rDNA 序列比對 NCBI 基因庫並繪製親緣樹圖，可發現序列最接近 *Clostridium thermopalmarium* (Soh *et al.*, 1991) 與 *Clostridium thermobutyricum* (Wiegel *et al.*, 1989) 兩株菌株，相似度最高為 98% 判斷可能為相同菌株，使用本研究各生理生化特性測試與兩株近株文獻進行特性比較，整理於 Table 4-2。

Table 4-2 Morphological and biochemical comparison of the isolate *Clostridium* sp. GI512 to other closely related *Clostridium*

	<i>Clostridium thermopalmarium</i>	<i>Clostridium thermobutyricum</i>	<i>Clostridium</i> sp. GI512
Reference	Soh <i>et al.</i> , 1990	Wiegel <i>et al.</i> , 1989	This study
Type	Straight rods	Straight rods	rods
Size(µm)	(wide)0.7-1.0; (long)2.0-8.0	(wide)0.9-1.1; (long)2.0-4.5	(wide)1.25; (long)4.75
Gram	negative	positive	positive
Spore	+	+	+
Oxygen	Strictly anaerobic	Strictly anaerobic	Strictly anaerobic
Temperature (°C)	50 – 60 (55)	26 – 61.5 (55)	35 – 65 (55)
pH	6.0 - 8.2 (6.6)	5.8 – 9.0 (6.8 – 7.1)	6.3-8.8 (7.1)
Source	Palm wine	Horse manure	Lizard feces
Antibiotic susceptibility:			
Ampicillin	x	-	+
Kanamycin	x	-	+
Penicillin	x	x	+
Polymyxin B	x	+	+
Vancomycin	x	x	+

Carbon source:

Gelatin	x	x	+
Glycerol	-	x	-
Pyruvate	+	x	+
Salicin	-	x	+
Starch	-	-	+
Sucrose	+	x	+
L-arabinose	-	-	+
L-rhamnose	+	-	+
D-cellobiose	+	+	+
D-fructose	+	+	+
D-glucose	+	+	+
D-lactose	-	x	+
D-maltose	+	+	+
D-mannitol	+	x	+
D-mannose	x	-	+
D-melezitose	x	x	+
D-raffinose	x	-	+
D-sorbitol	x	x	+
D-trehalose	x	x	+
D-xylose	+	+	+

1. Number in parenthesis indicates optimal growth temperature
2. Number in parenthesis indicates optimal growth pH
3. X, data no show.

4.6 醱酵平衡

Clostridium sp. GI512 於最適條件下培養，接種總培養體積 10% 至新鮮 TA 培養基控制環境條件為溫度 55°C、pH 為 7.0、碳源基質為 5 g/l 葡萄糖、1 g/l yeast extract 與不添加 peptone。培養 12 小時並分析基質降解量與氣相產物以及培養初始與終點之液相產物。

氣態產物計算方式為瓶頂空間氣體含量與各採樣點之排水集氣法氣體產量累加總合即為該氣體總產量。液態產物為培養 12 小時採樣分析，並除以該物質分子量集為該產物產量。計算結果可得最大氫氣產量為 0.88 mol/mol glucose，將數據與 *Clostridium* 菌屬微生物代謝葡萄糖醱酵產氫文獻研究比較，如 Table 4-3。計算醱酵最終產物與葡萄糖降解量 (Fig. 4-27 and 4-28) 並換算成莫耳濃度成醱酵平衡式 (4-1)。以醱酵平衡式比較發現代謝葡萄糖產丁酸低於 *Clostridium thermobutyricum* 菌株 (0.85 mol butyrate/mol glucose) (Wiegel *et al.*, 1991)。

Table 4-3 Comparison of hydrogen production from glucose by the isolate GI512 and other *Clostridium* sp.

Inoculum	Substrate	Maximum hydrogen yield(mol/mol)	References
<i>Clostridium beijerinckii</i> L9	Glucose	2.81	Lin <i>et al.</i> , 2007
<i>Clostridium</i> sp. Fanp2	Glucose	2.53	Pan <i>et al.</i> , 2008
<i>Clostridium acetobutyricum</i> M121	Glucose	2.29	Lin <i>et al.</i> , 2007
<i>Clostridium acetobutylicum</i>	Glucose	2.0	Chin <i>et al.</i> , 2003
<i>Clostridium butyricum</i> ATCC19398	Glucose	1.80	Lin <i>et al.</i> , 2007
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> FYa102	Glucose	1.47	Lin <i>et al.</i> , 2007
<i>Clostridium</i> sp. C4	Glucose	1.3	徐, 2007
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Glucose	1.08	Zhang <i>et al.</i> , 2006
<i>Clostridium</i> sp. GI512	Glucose	0.88	This study

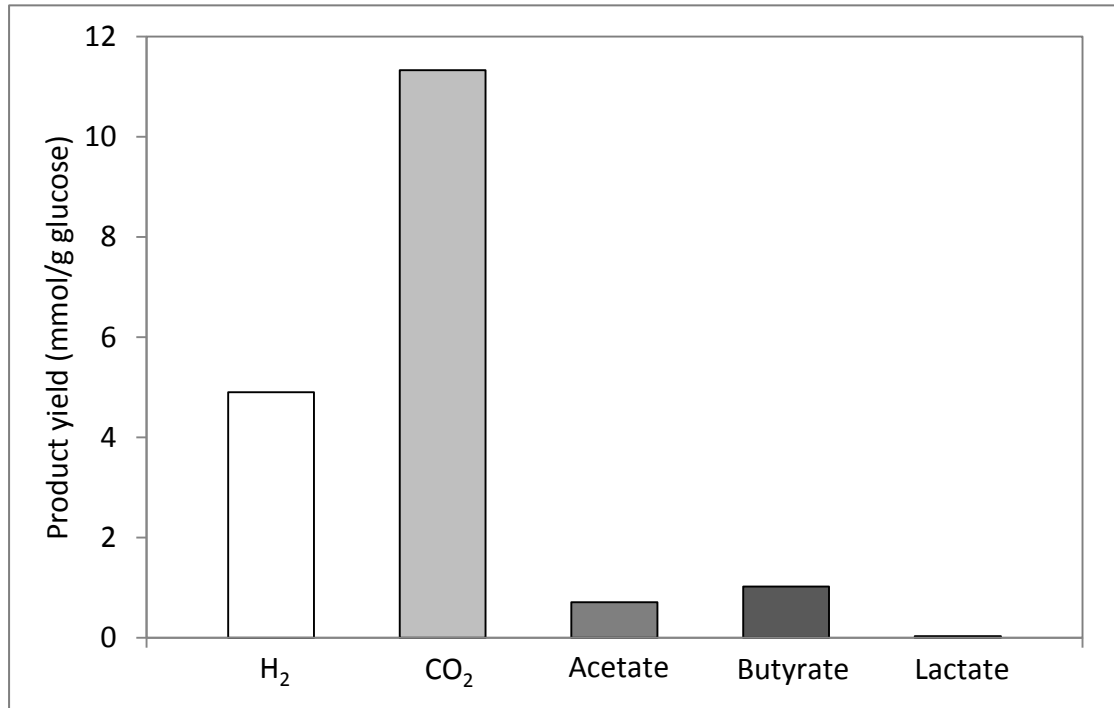
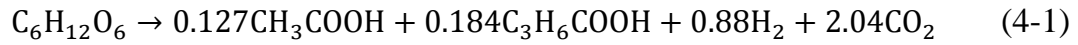


Figure 4-27 End-products yield of the isolate *Clostridium* sp. GI512 during fermentation from glucose.

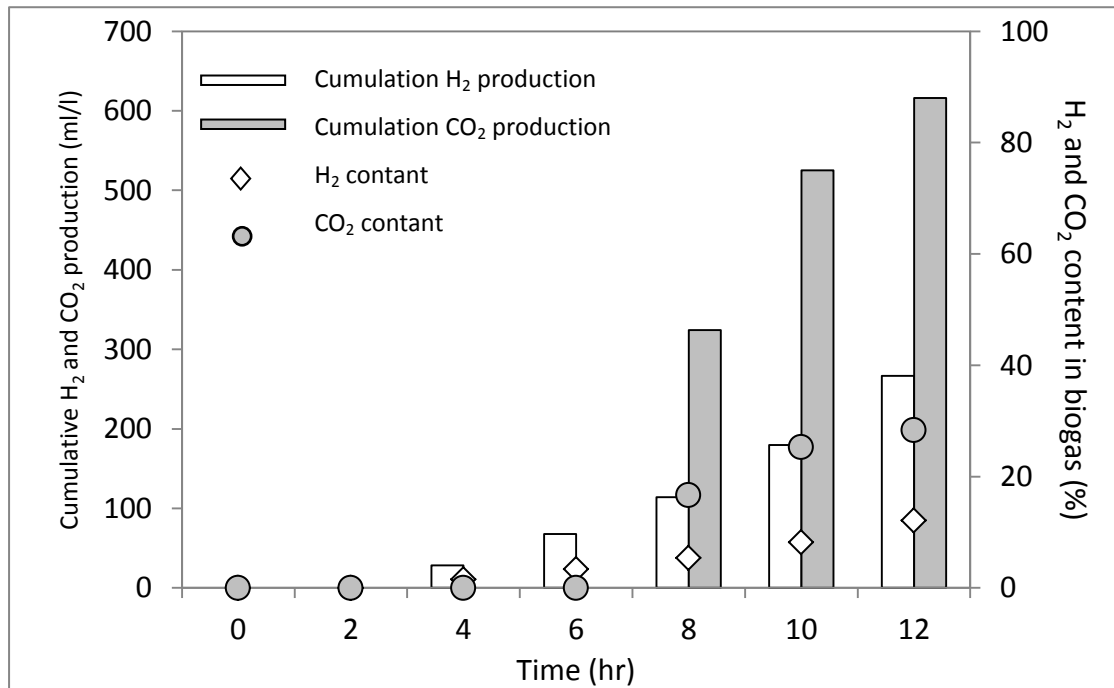


Figure 4-28 Cumulative hydrogen and CO₂ production and content of the isolate *Clostridium* sp. GI512 during fermentation from glucose.

第五章 結論

5.1 *Clostridium* sp. GI512 與序列相似菌株特性比較

本研究將綠鬣蜥糞便以纖維濾紙馴養，增富培養出高效能的穩定纖維水解菌群，根據熱休克篩選與厭氧滾管技術分離出七株醱酵產氫能力菌株，菌落外型乳白色，於固態培養中會產生巨大氣泡顯示具產氫能力，挑選其中一株產氫能力較佳，命名為 GI512 進行後續生理生化特性研究。

分離菌株 GI512 分析符合 Bergey's Manual 中 *Clostridium* 菌屬歸類之生理生化特性四大特徵(1)桿狀外型、(2)逆境條件時會形成內孢子、(3)無法進行硫酸還原作用以及(4)絕對厭氧生長。細胞壁結構為革蘭氏陽性菌，生長環境為中性 pH 與嗜高溫 55°C，Yeast extract 為生長時所需之必要物質，培養後期出現內含體。不具纖維素與木聚糖代謝能力，但能利用多種糖類物質，醱酵糖類物質產生主要產物為氫氣、二氧化碳與丁酸，以及少量醋酸與乳酸。無法還原硫酸鹽與硝酸鹽，且無固氮能力。以抗生素測試菌株耐受性時，Ampicillin 與 Polymyxin B 產生殺菌效果，而 Kanamycin 需較高濃度才能殺菌。Penicillin 與 Vancomycin 只能延長遲滯期並產生抑菌情形。各抗生素最小抑制濃度為 Ampicillin, 0.5 µg/ml、Kanamycin, 4.0 µg/ml、Penicillin, 8.0 µg/ml、Polymyxin B, 2.0 µg/ml 與 Vancomycin, 4.0 µg/ml。

Clostridium sp. GI512 進行 16S rDNA 序列比對 NCBI 基因庫並繪製親緣樹圖，可發現序列最接近 *Clostridium thermopalmarium* (Soh *et al.*, 1991) 與 *Clostridium thermobutyricum* (Wiegel *et al.*, 1989) 兩株菌株，相似度最高為 98% 判斷可能為相同菌株。

5.2 建議

本研究結果為分離鑑定厭氧醱酵產氫菌株 *Clostridium* sp. GI512 並針對此菌株進行初步生理生化特性研究，以 16S rDNA 序列鑑定與 *Clostridium thermopalmarium* strain BVP 與 *Clostridium thermobutyricum* 接近且相似度為 98%，但生理生化特性表現不同，建議能以如 DNA 雜合等分子生物技術，進行更精確鑑定或朝向亞種層級的分類進行研究

未來更可尋找產氫能力最佳化條件，如氫分壓、金屬離子種類與濃度以及 yeast extract 影響因子，亦可設計更大規模反應或連續流參數探討。而此菌株於本研究最適生長條件下產氫能力雖遜於其他文獻，但具有優異的丁酸生產能力，探討提高丁酸產量或後續串連代謝丁酸生產丁醇能力的菌株，產物生質丁醇亦為深具潛力之替代能源之一。

本實驗室前人由牛糞中成功分離出一株高效能纖維水解產氫能力菌株 *Clostridium thermocellum* TCW1，最佳產氫條件為厭氧環境、溫度 50—65°C 與 pH 6.99，與本研究菌株 *Clostridium* sp. GI512 相同條件，可進一步探討共培養產氫最適化研究。而文獻研究提到 *Clostridium thermocellum* 與本篇研究序列相似菌株 *Clostridium thermopalmarium* 共培養提高產氫能力的關鍵因子研究 (Geng *et al.*, 2010)，可作為後續研究之導向。

參考文獻

- Amann, R. I., Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*, Vol. 59: 143-169.
- Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. A., Domínguez-Espinosa, R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *TRENDS in Biotechnology*, Vol. 22: 477-485.
- Appelbaum PC, Kaufmann CS, Keifer JC, Venbrux HJ. (1983). Comparison of three methods for anaerobe identification. *Journal of Clinical Microbiology*, 18(3):614–621.
- Balat, M. (2008). Potential importance of hydrogen as a future solution to environmental and transportation problems. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol 33: 4013-4029.
- Barns, S. M., Fundyga, R. E., Jeffries, M. W., Pace, N. R. (1994). Remarkable archaeal diversity detected in a Yellowstone National Park hot spring environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 91: 1609-1613.
- Berinstein, P. (2001). *Alternative Energy: Facts, Statistics, and Issues*. Oryx Press.
- Bertoldi, de M., Vallini G, Pera A. (1983). The biology of composting: A review. *Waste Management & Research*, Vol. 1: 157–176.
- Bochner, B. R. (1989). Sleuthing out bacterial identities. *Nature* 339, 157 - 158.
- Brinkhoff, T., Hannen, E. J. V. (2007). Use of silicone grease to avoid “Smiling Effect” in denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, Vol. 9(4): 259-261.

- Burghardt, G. M. (2004) Iguana research: Looking back and looking ahead. In: *Iguanas: Biology and Conservation*, 1-12. Edited by Alberts, A. C., Carter, R. L., Hayes, W. K., Martins, E. P. University of California Press. California.
- Byrant, M. P. (1972). Commentary on the hungate technique for culture of anaerobic bacteria. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Vol. 25: 1324-1328.
- Cai, G., Jin, B., Saint, C., Monis, P. (2011). Genetic manipulation of butyrate formation pathways in *Clostridium butyricum*. *Journal of Biotechnology*. Vol. 155: 269–274.
- Cai, G., Jin, B., Saint, C., Monis, P. (2012). A genetic and metabolic approach to redirection of biochemical pathways of *Clostridium butyricum* for enhancing hydrogen production. *Biotechnology and Bioengineering*.
- Cato, E. P., George, W. L., Finegold, S. M. (1986). Genus *Clostridium* Prazmowski 1880, 23AL. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2: 1141-1200. Edited by Sneath, P. H. A. N., Mair, S., Sharpe, M. E., Holt, J. G. Spring. United States of America.
- Chin, H. L., Chen, Z. S., Chou, C. P. (2003). Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production. *Biotechnology Progress*, Vol. 19: 383–388.
- Chen, C. C., Lin, C. Y., Chang, C. Y. (2001). Kinetics of hydrogen production with continuous anaerobic cultures utilizing sucrose as the limiting substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 57: 56–64.
- Chen, S. D., Sheu, D. S., Chen, W. M., Lo, Y. C., Huang, T. I., Lin, C. Y. (2007). Dark hydrogen fermentation from hydrolyzed starch treated with recombinant amylase originating from *Caldimonas taiwanensis* On1. *Biotechnology Progress*, Vol. 23: 1312–1320.

- Cheong, D. Y., Hansen, C. L. (2007). Feasibility of hydrogen production in thermophilic mixed fermentation by natural anaerobes. *Bioresource Technology*, Vol. 98: 2229-2239.
- Chong, M. L., Raha, A. R., Shirai, Y., Hassan, M. A. (2009). Biohydrogen production by *Clostridium butyricum* EB6 from palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 34:764–771.
- Collet, C., Adler, N., Schwitzguébel, J. P., Peringer, P. (2004). Hydrogen production by *Clostridium thermolacticum* during continuous fermentation of lactose. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 29: 1479–1485.
- Collins, M. D., Lawson, P. A., Willems, A., Cordoba, J. J., Fernandez-Garayzabal J., Garcia, P., Cai, J., Hippe, H., Farrow, J. A. E. (1994). The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, Vol. 44(4): 812-826.
- Coyle, M.B. (2005). *Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Crouse, J., Amorese, D. (1987). Ethanol Precipitation: Ammonium Acetate as an Alternative to Sodium Acetate. *Focus* Vol. 9: 3–5.
- Demirbas, A. (2009). Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied Energy*, Vol. 86: S108-S117.
- Esser, P. (2010). pH and pressure in closed tissue culture vessels. *Technical Bulletin 5*. Thermo Fisher Scientific.
- Evvyernie, D., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K. (2001). Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Vol. 91: 339–343.
- Fan, Y. T., Xing, Y., Ma, H. C., Pan, C. M., Ho, H. W. (2008). Enhanced cellulose-hydrogen production from corn stalk by lesser panda manure. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 33: 6058-6065.

- Ferchichi, M., Crabbe, E., Hintz, W., Gill, G. H., Almadidy, A. (2005). Influence of Culture Parameters on Biological Hydrogen Production by *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* ATCC 27021. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 27: 855-862.
- Fermor, T.R., Randle, P. E., Smith, J. F. (1985). Compost as a substrate and its preparation. In: *The biology and technology of the cultivated mushroom*, 81-109. Edited by Flegg, P. B., Spencer, D. M., Wood, D. A. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, United Kingdom.
- Geng, A., He, Y., Qian, C., Yan, X., Zhou Z. (2010). Effect of key factors on hydrogen production from cellulose in a co-culture of *Clostridium thermocellum* and *Clostridium thermopalmarium*. *Bioresource Technology*, Vol. 101: 4029-4033.
- Gray, M. W., Sankoff, D., Cedergren, R. J. (1984). On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, Vol. 12: 5837-5852.
- Gutell, R., Gray, M., Schnare, M. (1993). A compilation of large subunit (23S and 23S-like) ribosomal RNA structures. *Nucleic Acids Research*, Vol. 21: 3055-3074.
- Hawkes, F.R., Dinsdale, R., Hawkes, D.L., Hussy, I. (2002). Sustainable fermentative hydrogen production: challenges for process optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 27: 1339–1347.
- Hill, G. T., N. A. Mitkowski, L. Aldrich-Wolfe, L. R. Emele, D. D. Jurkonie, A. Ficke, S. Maldonado-Ramirez, and S. T. Lynch, E. B. Nelson. (2000). Methods for assessing the composition and diversity of soil microbial communities. *Applied Soil Ecology*, 15, 25-36.
- Hippe, H., Andreesen, J.R. Gottschalk, G. (1991). The genera *Clostridium*. In *The Prokaryotes*, Vol. 2 pp 1800-1978. Edited by Albert, B., Hans, G.T., Martin, D., Wim, H., Karl-Heinz, K. Springer-Verlag, New York.

- Huang, S.M., R.G. Green, A.B. Plaskowski and M.S. Beck, (1988). Conductivity effects on capacitance measurements of two-component fluids using the charge transfer method. *J. Phys. E: Sci. Instrum.*, 21: 539-548.
- Hungate, R. E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. In: *Methods in Microbiology*, Vol. 3B: 117-132. Edited by Norris, J. R., Ribbons, D. W. Massachusetts.
- Holt, J.G., Krieg, N.R. (1994). Sulfate plus organic acid for sulfate reducers. In: *Method for General and Molecular Bacteriology*, Chapter 8: 195. Edited by Gerhardt, P., Murray, R.G.E., Wood, W.A., Krieg, N.R. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Johnson, J. L. (1994). Similarity analysis of DNAs. In: *Methods for General and Molecular Bacteriology*: 655-682. Edited by Gerhardt, P. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Johansson, T.B., Kelly, H., Reddy, A.K.N., Williams, R. H. (1993). *Renewable energy: sources for fuels and electricity*. Island Press. Washington, D. C.
- Johnson, J. L., Francis, B. S. (1975). Taxonomy of the Clostridia: ribosomal ribonucleic acid homologies among the species. *Journal of General Microbiology*, Vol. 88: 229-244.
- Kataoka, N., and Tokiwa, Y. (1998). Isolation and characterization of an active mannanase producing anaerobic bacterium, *Clostridium tertium* Kt-5A, from lotus soil. *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 84 (3): 357-367.
- Knapp, J.S. (1988). Historical perspectives and identification of Neisseria and related species. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 1: 415-431.
- Koku, H.; Eroglu, I., Gunduz, U., Yucel, M., Turker, L. (2003). Kinetics of biological hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodobacter sphaeroides* O.U. 001. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 28: 381-388.

- Kothari,R., Singh, D.P., Tyagi, V.V., Tyagi, S.K. (2012). Fermentative hydrogen production – An alternative clean energy source. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, Vol. 16: 2337– 2346.
- Lee, S.Y., Park, J.H., Jang, S.H., Nielsen, L.K., Kim, J., Jung, K.S. (2008). Fermentative butanol production by Clostridia. *Biotechnology and Bioengineering*, Vol. 101: 209-228.
- Levin, D. B., Islam, R., Cicek, N., Sparling, R. (2006). Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *Process Biochemistry*, Vol. 31: 1496–1503.
- Lin PY, Whang LM, Wu YR, Ren WJ, Hsiao CJ, Li SL. Biological hydrogen production of the genus Clostridium: metabolic study and mathematical model simulation. *Int J Hydrogen Energy* 2007;32:1728–1735.
- Lo, Y. C., Chen, W. M., Hung, C. H., Chen, S. D., Chang, J. S. (2008). Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies. *Water Research*, Vol. 42: 827–42.
- Lowe, M., Madsen, E. L., Schindler, K., Smith, C., Emrich, S., Robb, F., Halden, R. U. (2002). Geochemistry and microbial diversity of a trichloroethene-contaminated superfund site undergoing intrinsic in situ reductive dechlorination. *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 40: 123-134.
- Ludwig, W., Schleifer, K. H. (1994). Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. *FEMS Microbiology Reviews*, Vol. 15: 155-173.
- Marteinsson, V. T., Hauksdottir, S., Hobel, C. F., Kristmannsdottir, H., Hreggvidsson, G. O., Kristjansson, J. K. (2001). Phylogenetic diversity analysis of subterranean hot springs in Iceland. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 67: 4242-4248.

- Morimoto, M., Atsuko, M., Atif, A. A. Y., Ngan, M. A., Fakhru'l- Razi, A., Iyuke, S. E., Bakir, A. M. (2004). Biological production of hydrogen from glucose by natural anaerobic microflora. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 29: 709–713.
- Muyzer, G., Waal, de E. C., Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 59: 695-700.
- Muyzer, G., Smalla, K. (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, Vol. 73: 127-141.
- Nandi, S., Sengupta, S. (1998). Microbial production of hydrogen: an overview. *Critical Reviews in Microbiology*, Vol. 24: 61-84.
- Neu, H. C., Gootz, T. D. (1996). Antimicrobial Chemotherapy. In: *Medical Microbiology*, 4th edition, Chapter 11. Edited by Baron, S. Churchill Livingstone.
- Niemi, R. M., Heiskanen, I., Wallenius, K., Lindström, K. (2001). Extraction and purification of DNA in rhizosphere soil samples for PCR-DGGE analysis of bacterial consortia. *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 45: 155–165.
- Oh, Y. K., Seol, E. H., Lee, E. Y., Park, S. (2002). Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodopseudomonas palustris* P4. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 27: 1373–1379.
- Oh, S.E., Zuo, Y., Zhang, H., Guiltinan, M. J. (2009). Hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 and megaplasmid-deficient mutant M5 evaluated using a large headspace volume technique. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 34: 9347–9353.

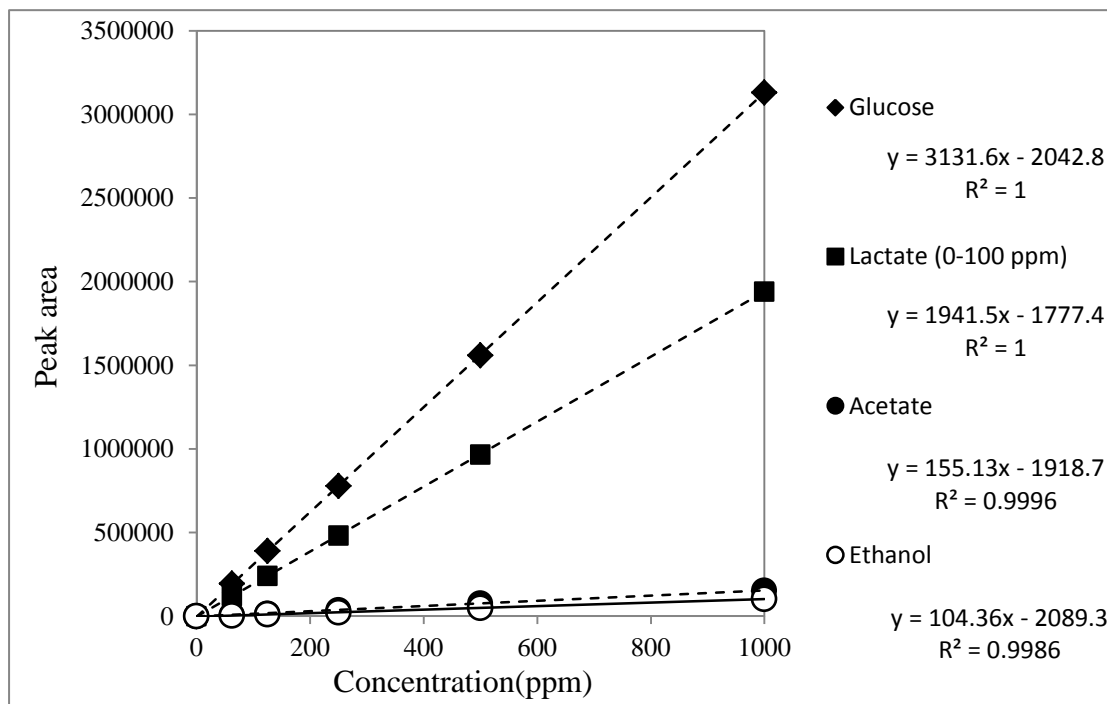
- Olsen, G. J., Lane, D. J., Giovannoni, S. J., Pace, N. R. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Reviews of Microbiology*, Vol. 40: 337-365.
- Pan, C. M., Fan, Y. T., Xing, Y., Hou, H. W., Zhang, M. L. (2008). Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fanp2. *Bioresource Technology*, Vol. 99: 3146–3154.
- Pattra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., Reungsang, A. (2008). Biohydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 33: 5256-5265.
- Reimann, A., Biebl, H., Decker, W.D. (1996). Influence of iron, phosphate and methyl viologen on glycerol fermentation of *Clostridium butyricum*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, Vol. 45: 47-50.
- Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, Vol. 4: 406-425.
- Sambrook, J., Russell, D.W. (2001). Gel electrophoresis of DNA and pulsed-field agarose gel electrophoresis. In: *Molecular cloning: A laboratory manual*, Chapter 5. Cold spring harbor, New York.
- Sims R.E.H. (2002). The brilliance of bioenergy: In business and in practice. London: James & James; 2002.
- Soh, A.L.A., Ralambotianal, H., Ollivier, B., Prensier, G., Tine, E., Garcia, J.L. (1991). *Clostridium thermopalmarum* sp. nov., a Moderately Thermophilic Butyrate-Producing Bacterium Isolated from Palm Wine in Senegal. *Systematic and Applied Microbiology*, Vol. 14: 135-139.
- Sparling, R., Risbey, D., Poggi-Varaldo, H.M. (1997) Hydrogen production from inhibited anaerobic composters. *Int. J. Hydrogen Energy*, 22, 563–566.

- Stackebrandt, E., Rainey, F. A. (1997). Phylogenetic relationships. In: *The Clostridia: Molecular Biology and Pathogenesis*: 3-19. Edit by Rood, J. I. B., McClane, A., Songer, J. G., Titball, R. W. Academic Press. New York.
- Taguchi, F., Hasegawa, K., Saito-Taki, T. (1995). Hydrogen production from continuous fermentation of xylose during growth of *Clostridium* sp. strain No. 2. *Canadian Journal of Microbiology*, Vol. 41: 536-540.
- Taguchi, F., Yamada, K., Hasegawa, K., Taki-Saito, T., Hara, K. (1996). Continuous hydrogen production by *Clostridium* sp. strain no. 2 from cellulose hydrolysate in an aqueous two-phase system. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 82: 80–83.
- Tamura, K., Nei, M., Kumar, S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighborjoining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 101: 11030-11035.
- Valdez-Vazquez, I., Ponce-Noyola, M. T., Poggi-Varaldo, H. M. (2009). Nutrients related to spore germination improve H₂ production from heat-shock-treated consortia. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 34: 4291—4295.
- Wang, J., Wan, W. (2009). Factors influencing fermentative hydrogen production: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol 34: 799-811.
- Ward, D. M., Bateson, M. M., Weller, R. Ruff-Roberts, A. L. (1992). Ribosomal RNA analysis of microorganisms as they occur in nature. In: *Advances in microbial ecology*: 219–286. Edit by Marshal, K. C. Plenum Press, New York.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., Trüper, H. G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 37: 463–464.

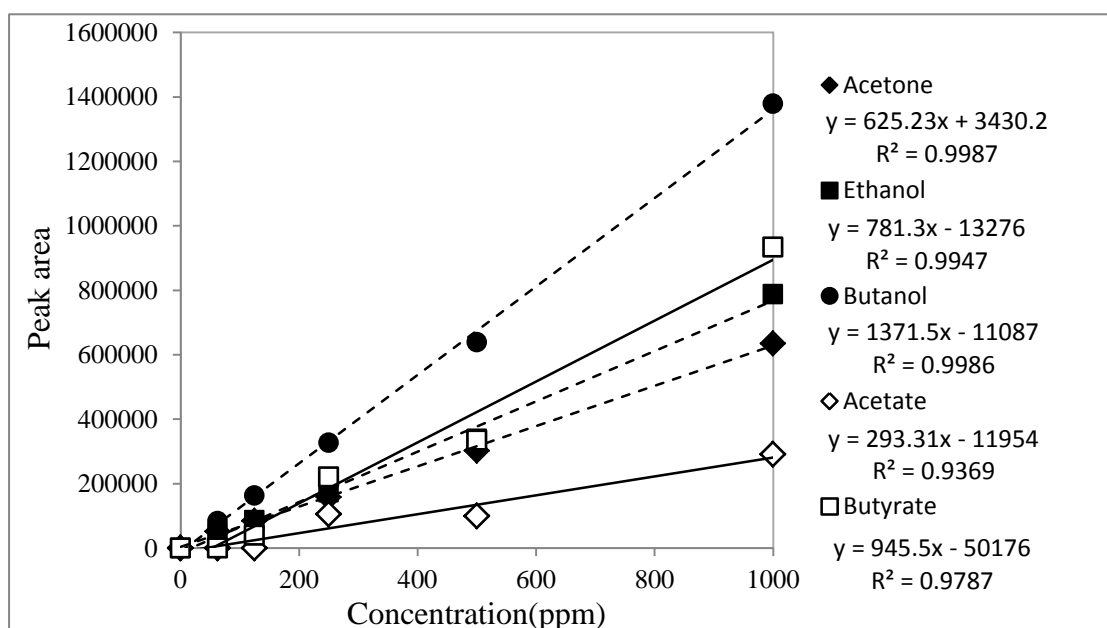
- Westermanna, P., Jørgensen, B., Lange, L., Ahring, B.K., Christensen, C.H. (2007). Maximizing renewable hydrogen production from biomass in a bio/catalytic refinery. *International Journal of Hydrogen Energy*, Vol. 32: 4135-4141.
- Wiegel, J., Kuk, S. U., Kohring, G. W. (1989). *Clostridium thermobutyricum* sp. nov. , a moderate thermophile isolated from a cellulolytic culture, that produces butyrate as the major product. *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 39: 199-204.
- Wiegel, J., Tanner, R., Rainey, F. A. (2006). An Introduction to the Family Clostridiaceae. In: *Prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria*, Vol. 4: Bacteria: Firmicutes, Cyanobacteria: 654–678. Edit by Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K. H., Stackebrandt, E. Springer. New York.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, Vol. 51: 221–71.
- Yu, Z., Morrison, M. (2004). Comparisons of Different Hypervariable Regions of rrs Genes for Use in Fingerprinting of Microbial Communities by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70: 4800-4806.
- Zhang, H., Bruns, M. A., Logan, B. E. (2006). Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor. *Water Research*, Vol. 40: 728–734.
- 王馨儀。(2005)。以牛糞中嗜熱厭氧菌群分解纖維素產乙醇之研究，東海大學環境科學與工程學研究所碩士論文。
- 徐維廷。(2005)。纖維水解菌群中嗜熱產氫菌 *Clostridium* sp. C4 之分離及其產氫特性研究，東海大學環境科學與工程學研究所碩士論文。
- 廖經裕。(2004)。以分子生物方法與培養方式分析台灣兩處溫泉之嗜熱菌族群，東海大學環境科學與工程學研究所碩士論文。

附錄

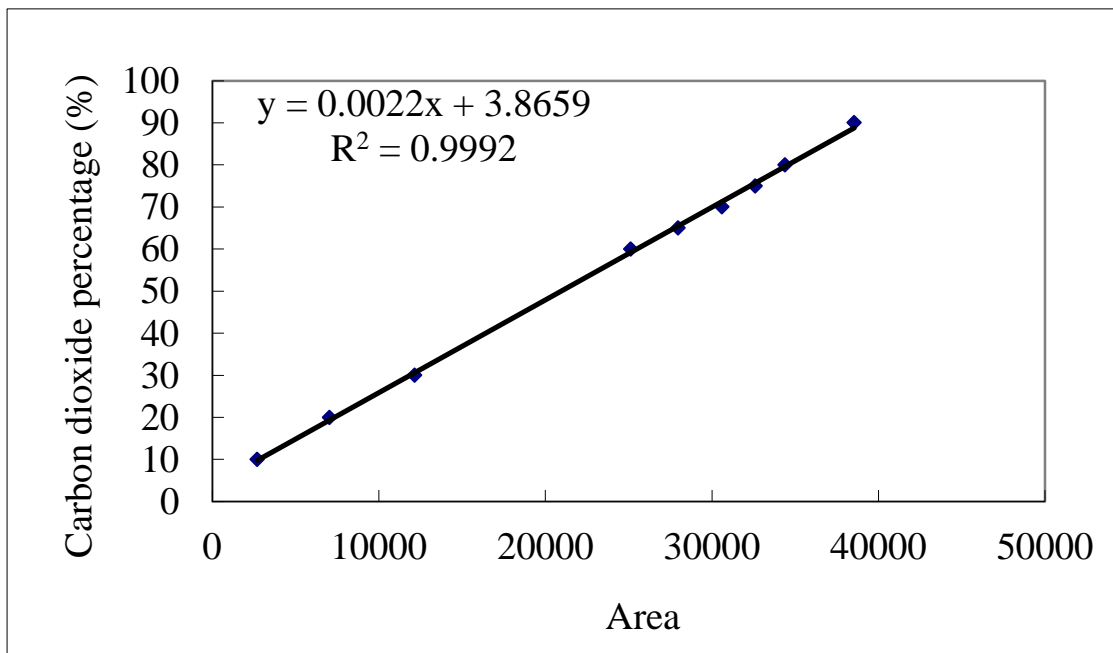
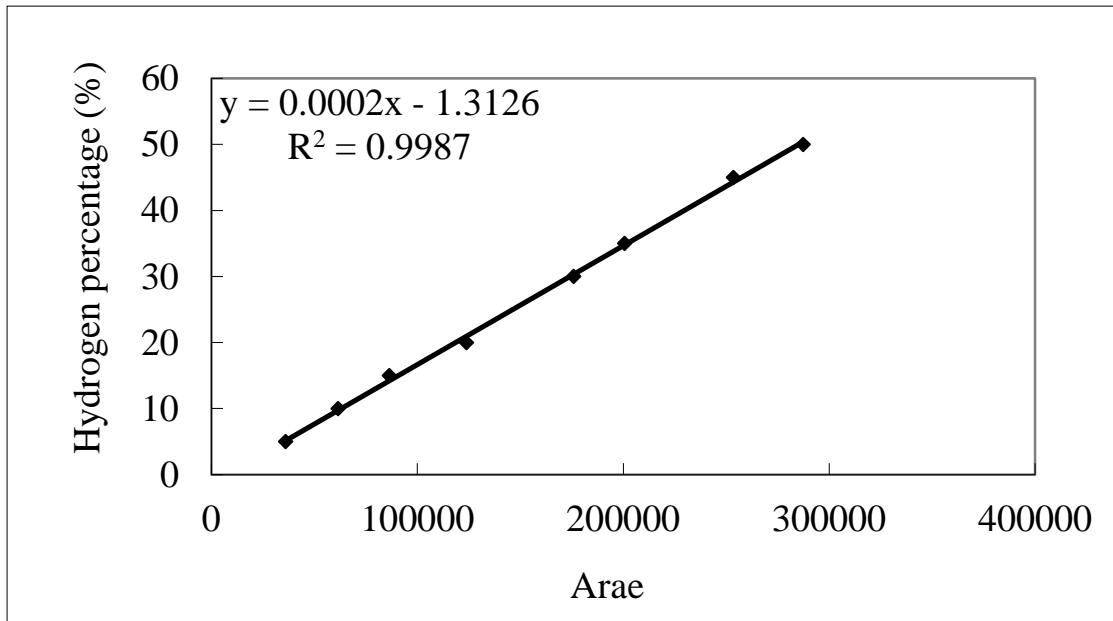
附錄一 GC-TCD 氣相產物檢量線



附錄二 GC-FID 液態產物檢量線



附錄三 氫氣與二氧化碳檢量線



附錄四 *Clostridium* sp. GI512 16S rDNA 序列

(NCBI Accession 1544408)

GCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGCAACCTGCCTTAGTGAGGGGGA
TAGCCTCCCGAAAGGGAGATTAATACCGCATAACATTATTTTATCGCA
TGATAGAATAATCAAAGGAGCAATCCGCACTAAGATGGGCCC GCGGC
GCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGT
AGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGA ACTGAGACACGGT
CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCGCAATGGGG
GAAACCCTGACGCAGCAACGCCGCGTGAGCGATGAAGGTCAGATTC
GGATTGTAAAGCTCTGTCTTTAGGGACGATAATGACGGTACCTAAGG
AGGAAGCCACGGTCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTACGACTCTA
TACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTACTGGGCGTAAAGACATG
GTATGTAGGCGGATATTTAAGTCAGATGTGAAATTC CCGGGCTTAACC
TGGGCGCTGCATTTGATACTGGATATCTAGAGTGTGGGAGAGGAAAG
CGGCAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATTAGGAAGAAC
ACCAGTGGCGAAGGCGGCTTAATTTTGAGTTTCCTTAACTGCCCCTG
GGATACGTGTTTCGTCGCCTCGTACACCAAATTAAGCTTCGTTGCGCTT
CTTGGAATGGATCATGAACTGTAGAGGACTTAATGAGCATTACCTCCT
TCGGGAAGCCCCGTCCTTCTGTCCACCACGTACCAACAGCAGTCGA
GCACAGCACTCTACAACCCAGATTCAGGGCGTTGCTCGCGTTGGGAA
TAGCAATCAACGATGGTAATTCAACTCGTGAGATTGCTCTGACGGCG
CCAATTGCACCTCCTTCCACCCCTACTGCAGTTTAGTAGTACGGGGAA
TACAGATCCCGATGTGTGCACGATGTTACCGGCCATGTTGCTCTACGT
TTGGGCACTCCCCCTCGGTTTGAAGTTTCGGCCAGGGTCAAGCCTAA
CATCCGACTTTGAGCGGATGTACTTCAGCCTCAACGATCATTAGCGCT
TAGTCGTACAGCGCCACTTATGCAAGGGCCCAGAACATGTGTGGCGG
GCAGTGTGGTACTCTCGGCCATTGTGGGCTTCAGGCACT